

Die Etablierung massenspektrometrischer
quantitativer Studien des Herzproteoms während
der embryonalen Entwicklung und der Alterung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung
des akademischen Grades
doctorum rerum naturalium
- Dr. rer. nat. -

des Fachbereiches Biologie und Chemie (FB 08)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Anne Konzer

aus Frankfurt/Oder

Gießen, 2012

Die vorliegende Arbeit wurde am
Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung (W.G. Kerckhoff Institut)
in Bad Nauheim angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Clauss
Institut für Tierphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Braun
Abteilung Entwicklung und Umbau des Herzens
Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim

Tag der mündlichen Prüfung: 01. November 2012

Eidesstattliche Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. 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.

Gießen, den 03.08.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Evolution des Herzens	1
1.2. Die Physiologie des Herzens	2
1.2.1. Evolutionäre Merkmale des Vertebratenherzens	2
1.2.2. Herzphysiologie wasseratmender Fische	3
1.2.3. Herzphysiologie der Säugetiere	4
1.2.4. Herzmuskelkontraktion	4
1.3. Der Zebrafisch als Modellorganismus für die Herzforschung	7
1.4. Embryonale Entwicklung im Zebrafisch	8
1.4.1. Überblick der Embryogenese im Zebrafisch	8
1.4.2. Herzentwicklung: Spezifizierung und Differenzierung der kardialen Vorläuferzellen	9
1.4.3. Herzentwicklung: Ausbildung des Herzschlauchs und Kammerbildung	11
1.5. ALCAM - ein wichtiger Faktor für die Herzentwicklung im Zebrafisch	12
1.6. Adaptive Prozesse während der Herzalterung	13
1.7. Cardiomics: Integrative Studien von Kardiomyozyten auf Transkript- und Proteomebene	14
1.8. Massenspektrometrie	15
1.8.1. Der LTQ-Orbitrap Massenspektrometer kombiniert die Peptidfrag- mentierung und Detektion	17
1.8.2. Quantitative Proteomics - Metabolische Markierung mit stabilen Iso- topen	20
1.8.3. Metabolische Markierung von mehrzelligen Organismen	22
1.9. Zielsetzung der Arbeit	24
2. Material und Methoden	27
2.1. Verwendete Chemikalien und Materialien	27

2.2. Chemikalien und Materialien für die Massenspektrometrie	27
2.3. Molekularbiologische Kits	28
2.4. Enzyme	28
2.5. Antikörper	28
2.6. Medien und Agarplatten	29
2.7. Puffer	29
2.8. Verwendete Geräte	30
2.9. Markierung von Modellorganismen mit $^{13}\text{C}_6$ -Lysin	31
2.9.1. Markierung von <i>Escherichia coli</i>	31
2.9.2. Markierung von <i>Saccharomyce cerevisiae</i>	31
2.9.3. Markierung von <i>Drosophila melanogaster</i>	31
2.10. Arbeiten mit dem Modellorganismus <i>Danio rerio</i>	32
2.10.1. Aufzucht und Haltung von Zebrafischen	32
2.10.2. Markierung von <i>Danio rerio</i> mit $^{13}\text{C}_6$ -Lysin	32
2.10.3. Präparation von Organen adulter Zebrafische	33
2.10.4. Isolierung embryonaler Zebrafischherzen	33
2.10.5. Gezielter <i>knockdown</i> der Proteinexpression durch Morpholino	33
2.11. Arbeiten mit dem Modellorganismus <i>Mus musculus</i>	34
2.11.1. Isolierung adulter Maus-Kardiomyozyten	34
2.12. Molekularbiologische Methoden	35
2.12.1. Gesamt-RNA-Isolierung	35
2.12.2. Genexpressionsanalyse mittels Microarray	36
2.13. Proteinbiochemische Methoden	36
2.13.1. Aufbereitung von Proteinextrakten - Gewebehomogenisierung und Zellyse	36
2.13.2. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels <i>DC Protein assay</i>	37
2.13.3. Proteinfällung mittels Aceton	37
2.13.4. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.13.5. Coomassiefärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	38
2.13.6. Enzymatische Spaltung von Proteinen in Lösung	39
2.13.7. Enzymatische Spaltung von Proteinen im Gel	40
2.13.8. <i>Filter aided sample preparation</i> - FASP	41
2.13.9. Isoelektrische Fokussierung von Peptiden	43

2.14. Massenspektrometrie	43
2.14.1. Umkehrphasenchromatographie	43
2.14.2. ESI-Tandem-Massenspektrometrie	44
2.14.3. Datenverarbeitung mit MaxQuant	44
2.15. Immunhistochemische Methoden	45
2.15.1. <i>Whole-mount</i> -Antikörperfärbung mit zn-8 gegen ALCAM	45
2.15.2. Allgemeines Protokoll zur <i>Whole-mount</i> -Antikörperfärbung von Zebrafischembryonen	46
3. Ergebnisse	47
3.1. Die Proteinausstattung der Herzmuskelzellen limitiert die massenspektrometrische Analyse	47
3.2. Markierung von <i>Danio rerio</i> mit $^{13}\text{C}_6$ -Lysin	53
3.2.1. Markierung von Modellorganismen für die Herstellung des SILAC-Fischfutters	53
3.2.2. Die partielle SILAC-Markierung reflektiert die Beschaffenheit verschiedener Gewebetypen	56
3.2.3. Charakterisierung regenerativer Prozesse in der Schwanzflosse von <i>D. rerio</i>	60
3.2.4. Vollständige SILAC-Markierung des Zebrafisches in der F1-Generation	64
3.2.5. Hohe Präzision SILAC-basierender Proteinquantifizierung	67
3.3. Quantitative Proteomstudie der embryonalen Herzentwicklung in Zebrafischen	71
3.3.1. Durchführung der embryonalen Herzstudie	71
3.3.2. Zunehmende Differenzierung subzellulärer Strukturen von Kardiomyozyten zwischen 72 und 120 hpf	73
3.4. Quantitative Proteomstudie des Morpholino-basierenden ALCAM- <i>knockdowns</i> in Zebrafischen	79
3.4.1. ALCAM-Morphanten weisen eine verzögerte Differenzierung der Retina auf	79
3.4.2. Die Genexpressionsanalyse von ALCAM-Morphanten bestätigt die verzögerte Augenmorphogenese	85
3.4.3. ALCAM beeinflusst die Zelladhäsion und die Organisation des Cytoskeletts im Herzen	88

3.4.4.	Die Validierung von ALCAM-regulierten Kandidaten mittels <i>Whole-mount</i> -Antikörperfärbung	91
3.5.	SILAC-Maus-basierende quantitative Alterungsstudie von Kardiomyozyten .	95
3.5.1.	Die SILAC-Maus als interner Proteinstandard	95
3.5.2.	Kardiomyozyten nach 22 Monaten weisen eine erhöhte Expression von Proteinen des Keton-Metabolismus auf	95
3.5.3.	Erhöhte Expression von BDH1 in Kardiomyozyten nach 30 Monaten	100
4.	Diskussion	107
4.1.	Identifikation und Quantifikation von Proteinen mittels modernen Methoden der Proteomics	107
4.1.1.	Differenzierte Zellen limitieren die massenspektrometrische Analyse .	108
4.1.2.	Die Vorteile der SILAC-basierenden Proteinquantifizierung	109
4.2.	Die Etablierung des SILAC-Zebrafisches	110
4.2.1.	Die Verwendung von SILAC ermöglicht Proteinstudien in Zebrafischen	110
4.2.2.	Die Ernährung der Zebrafische mit SILAC-Futter führt zu einer verringerten Körpergröße	112
4.2.3.	Die partielle SILAC-Markierung reflektiert die Beschaffenheit verschiedener Gewebetypen anhand von Markierungsraten	113
4.2.4.	Der SILAC-Zebrafisch ermöglicht die Charakterisierung regenerativer Prozesse	114
4.2.5.	Hohe Präzision und Reproduzierbarkeit der Proteinquantifizierung basierend auf dem SILAC-Zebrafisch	117
4.3.	Quantitative Proteomstudie der embryonalen Herzentwicklung in Zebrafischen	119
4.4.	Quantitative Proteomstudie des Morpholino-basierenden ALCAM- <i>knockdowns</i> in Zebrafischen	121
4.4.1.	Der Morpholino-basierende <i>knockdown</i> von ALCAM erfolgt ohne unspezifische Nebeneffekte	122
4.4.2.	Der Verlust von ALCAM führt zu einer defekten Differenzierung neuronaler Zellen in der Retina	124
4.4.3.	Korrelation zwischen Transkriptom- und Proteomdaten der ALCAM-Morphanten	126
4.4.4.	ALCAM reguliert die frühe Herzmorphogenese	128
4.5.	Maus-Kardiomyozyten zeigen minimale Adaptionen während der Alterung .	131

5. Zusammenfassung	137
6. Summary	139
Literaturverzeichnis	141
A. Zusätzliche Abbildungen	157
B. Abkürzungsverzeichnis	161
C. Tabellen	165
D. Veröffentlichungen	173
D.1. Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der Dissertation	173
D.2. Über das Dissertationsthema hinausgehende Veröffentlichungen	174
E. Danksagung	175

1. Einleitung

Das Herz der Tiere ist der Urquell ihres Lebens, es ist die Sonne ihres Mikrokosmos, von ihr hängt alles Wachstum ab, von ihr stammt alle Kraft.

William Harvey

Die zentrale Rolle des Herzens wurde bereits in der Antike beschrieben. Allerdings wurde das Organ als Sonne des Körpers und Sitz der Seele verklärt. Die Theorien von Galen von Pergamon (ca. 129-216 n.Chr.), nach denen das Blut in der Leber aus verdauter Nahrung gewonnen wird, halten sich bis ins 17. Jahrhundert. Der epochale Umbruch erfolgt durch Wissenschaftler und Anatome wie William Harvey (1578-1657). Auf Grund eigener Beobachtungen und Erkenntnisse seiner Kollegen schlussfolgerte er, dass die grundlegende Funktion des Herzens die Kontraktion ist. Das Herz ist eine Pumpe, die das Blut durch die Adern treibt. Harvey entwickelte die Theorie, dass das Blut durch den Körper in einem Kreislauf zirkuliert und begründete damit die moderne Physiologie. Noch heute sind viele Fragen über die physiologischen Prozesse im Herzen ungeklärt. Vor allem pathologische Entwicklungen und molekulare Defekte fordern eine weitere Aufklärung.

1.1. Die Evolution des Herzens

Für die effiziente Versorgung mehrzelliger Organismen entwickelten sich Mechanismen, welche die Zufuhr an Nährstoffen und Sauerstoff sowie die Ausscheidung von Kohlendioxid und Stoffwechselprodukten gewährleisten. Da Diffusion und Osmose schon bei einfachen Mehrzellern wie *Porifera* (Schwämmen) und *Coelenterata* (Hohltieren) nicht ausreichen, entstanden verschiedene Transportsysteme wie das einfache Gastrovaskularsystem oder komplexen Kreislaufsysteme. Obwohl sich die Systeme in Aufbau und Funktion wesentlich voneinander unterscheiden, basieren sie doch alle auf der Verwendung von Pumpen, die den Massenstrom der Körperflüssigkeiten antreiben. Neben den kleinen Mikropumpen wie Cilien oder Flagellen, welche u.a. bei einfachen Mehrzellern zu finden sind, sind vor allem

die größeren Pumpeinheiten (*Macropumps*) für die Entwicklung komplexer Kreislaufsysteme von Bedeutung. Dabei handelt es sich um spezialisierte, muskuläre Pumporgane, die den Strom der Körperflüssigkeiten durch das gesamte Gefäßsystem antreiben (LaBarbera und Vogel, 1982).

Die *Macropumps* werden in vier Kategorien gegliedert: gekammerte Herzen, tubuläre (röhrenförmige) Herzen, pulsierende Blutgefäße und akzessorische Pulsationsorgane (Ampullen) (Xavier-Neto et al., 2010). Letztere werden auch als Neben- oder Hilfs Herzen bezeichnet, weil es sich um muskuläre Gefäße handelt, die zusätzlich zum Herzen die Versorgung peripherer Bereiche gewährleisten. Vor allem bei *Crustacea* und *Insecta* sind sie weit verbreitet, um enge, röhrenförmige Körperanhänge wie Beinen, Flügel oder Antennen mit Hämolymphe zu versorgen (Pass, 2000). Des Weiteren kommen akzessorische Pulsationsorgane als „lymphatische Herzen“ bei *Pisces*, *Amphibia* und *Reptilia* vor. Tubuläre Herzen und pulsierende Blutgefäße befördern das Blut mittels rhythmischer Muskelkontraktionswellen (Peristaltik) durch den Körper. Die Grenze zwischen beiden Kategorien ist fließend, wobei es sich bei letzterem um Blutgefäße handelt, die vordergründig die Weiterleitung des Blutes zur Aufgabe haben und nur langsam peristaltisch kontrahieren. Vor allem bei *Annelida* (Ringelwürmer) sind die pulsierenden Blutgefäße anzutreffen. Im Gegensatz dazu sind tubuläre Herzen gestreckte Organe, deren Pumpfunktion im Vordergrund steht. Sie werden myogen oder neuronal gesteuert und kommen in *Tunicata* (Manteltiere), *Annelida* und *Arthropoda* (Gliederfüßer) vor. Bei den Pumporganen mit der höchsten Komplexität handelt es sich um die gekammerten Herzen der *Vertebrata* (Wirbeltiere) und *Mollusca* (Weichtiere) (Romer, 1962). Die Anzahl der Kammern variiert zwischen zwei bis vier. Die Herzen bestehen aus einem oder mehreren Vorhöfen (Atrien), die als Reservoir dienen und aus einem oder zwei kontraktilen Ventrikeln. Gekammerte Herzen erscheinen oft in Kombination mit einem geschlossenen Kreislaufsystem und erzeugen einen weit höheren Druck als tubuläre Herzen.

1.2. Die Physiologie des Herzens

1.2.1. Evolutionäre Merkmale des Vertebratenherzens

Die Formbildung des Herzens innerhalb der *Vertebrata* verlief sehr divergent, bedingt durch die Entwicklung großer bzw. aktiver Arten mit komplexen Verhaltensmustern sowie durch die Evolution der Lungenatmung und dem Übergang zum Landleben. Für das

Herz-Kreislaufsystem folgte daraus eine tendenzielle Entwicklung hin zu einem zentralen Pumporgan.

Da die Wirbeltiere der marinen Umgebung entstammen, basiert die Definition der Herzkammern auf der Anatomie der Fische (Kardong, 2002). Bei den vier Herzkompartimenten, die als Kammern der *Vertebrata* definiert werden, handelt es sich um den *sinus venosus*, das Atrium, den Ventrikel und dem *conus arteriosus* (ventrikulärer Ausflusstrakt). Alle Komponenten zeichnen sich durch folgende Merkmale aus: die Herzsegmente liegen innerhalb der Perikardhöhle, sind durch Herzklappen voneinander getrennt, bestehen aus quergestreifter Herzmuskulatur und kontrahieren simultan. Die Bestimmung dieser Merkmale ist nicht immer eindeutig, da während der Evolution Herzsegmente zurückgebildet wurden, fusioniert sind oder sich in mehrere Kompartimente geteilt haben (Simoes-Costa et al., 2005).

1.2.2. Herzphysiologie wasseratmender Fische

Das Herz wasseratmender Fische der *Elasmobranchia* (Knorpelfische) und einiger *Teleostei* (Knochenfische) besteht aus vier, in Reihe geschalteter Kammern (Eckert, 2002). Das sauerstoffarme, venöse Blut aus den Rumpfreionen strömt in den großvolumigen *sinus venosus* und wird dort gesammelt. Anschließend wird es in das Atrium und den Ventrikel gepumpt, wobei Herzklappen zwischen den Kammern einen Rückstrom verhindern. Durch die Kontraktion den Ventrikels fließt das Blut über den *conus arteriosus* (bei Knochenfischen: *bulbus artriosus*) in die *Aorta ventralis* und zu den Kiemengefäßen. Nach der Passage durch die Kiemen wird das nun sauerstoffreiche Blut über die *Aorta dorsalis* in den Kopf und in die Rumpfreionen geführt. Kiemen- und Körperkreislauf sind daher bei wasseratmenden Fischen in Reihe geschaltet.

Die vier Herzkammern bilden während der embryonalen Entwicklung eine S-förmige Schleifenstruktur aus. Die kontraktilen Kammern bestehen aus einer dicken Schicht quergestreifter Herzmuskulatur (Myokard), die mit einer dünnen Lage endothelialen Gewebes (Endokard) ausgekleidet ist. Das Myokard wird zusätzlich von einer Schicht endothelartiger Zellen umgeben, dem Epikard. Das Herz befindet sich in der Perikardhöhle dorsal am hinteren Kopfbereich.

1.2.3. Herzphysiologie der Säugetiere

In der Klasse der *Mammalia* (Säugetiere) weicht die Ausprägung der Herzkammern von der ursprünglichen Definition ab. Da sowohl der *sinus venosus* als auch der *conus arteriosus* keine separaten Kammern formen, werden nur die Atrien und Ventrikel als funktionelle Herzkammern definiert (Christoffels et al., 2000).

Das Kreislaufsystem der Wirbeltiere besteht aus einem Körper- und einem Lungenkreislauf, die parallel geschaltet sind (Clauss und Clauss, 2006). Das venöse Blut aus dem Körper wird im rechten Atrium gesammelt und durch die Segelklappe (Trikuspidalklappe) in den rechten Ventrikel gepumpt. Auf Grund der Kontraktion des Ventrikels wird das Blut durch die Pulmonalklappe über die Lungenarterie in die Lunge geführt und mit Sauerstoff angereichert. Das sauerstoffreiche Blut fließt von der Lungenvene durch das linke Atrium, wo es durch die Segelklappe (Mitralklappe) in den linken Ventrikel gepumpt wird. Auf Grund der Kontraktion des Ventrikels wird das Blut durch die Taschenklappe (Aortenklappe) in die Aorta und in den Körper getrieben.

1.2.4. Herzmuskelkontraktion

Die hier beschriebenen Merkmale der Herzmuskelkontraktion wurden zusammengefasst aus Eckert (2002) und Clauss und Clauss (2006). Der Herzmuskel gehört zum Typus der quergestreiften Muskulatur und besitzt viele Charakteristika der Skelettmuskulatur. Die Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) sind ausdifferenzierte Muskelzellen des Herzens, welche die Kontraktilität der Ventrikel und somit die Pumpfunktion des Herzens gewährleisten. Um diese Funktion ausüben zu können, besitzen die Zellen spezialisierte kontraktile Einheiten, die Sarkomere, mit denen sich die Zellen zusammenziehen können und für die Verkürzung des Muskels durch sich überlappende Aktin- und Myosinfilamenten sorgen. Die Sarkomere bestehen aus einer Reihe von Strukturproteinen wie Titin, Myosin und Aktin, die z.T. eine beachtliche Größe erreichen können (Titin: 3,6 MDa). Des Weiteren zeichnen sich Kardiomyozyten durch eine große Anzahl an Mitochondrien aus, um den Bedarf an ATP für die Kontraktion bereitzustellen. Im Gegensatz zum Skelettmuskel wird die Kontraktion des Herzens myogen gesteuert. Die Innervierung der Herzmuskulatur erfolgt durch die elektrische Aktivität der Schrittmacherregion (Sinusknoten) im Herzen, die eigenständig ein depolarisierendes Membranpotential hervorbringt. Der neuronale Einfluss ist auf autonome Nerven des Parasympathikus und Sympathikus begrenzt, die eine modulierende Funktion besitzen, aber keine postsynaptischen Signale erzeugen. Die Aktionspotentiale

(AP) der Schrittmacherzellen werden über *gap junctions* von Muskelzelle zu Muskelzelle weitergeleitet.

Die Aktionspotentiale verlaufen entlang der Zellmembran der Muskelzellen (Sarkolemma) und werden über die transversalen Tubuli (T-Tubulus) tief in die Muskelfasern geleitet (Abbildung 1A). Dabei wird die Membran der T-Tubuli depolarisiert, um neue APs zu bilden und weiterzuleiten. Spannungssensitive Dihydropyridinrezeptoren (DHPR), die sich in der Membran der T-Tubuli befinden, werden durch ankommende APs aktiviert und öffnen L-Typ-Calciumkanäle. Extrazelluläres Calcium strömt in das Sarkoplasma (Cytoplasma der Muskelzellen) und führt zur Öffnung der Ryanodinrezeptoren (RyR) des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) (Abbildung 1B). Das SR bildet eine Spezialform des Endoplasmatischen Retikulums in Muskelzellen und dient als Speicher für Ca^{2+} -Ionen. Nach der Öffnung der Ryanodinrezeptoren strömen Ca^{2+} -Ionen aus dem SR in das Sarkoplasma und diffundieren zu den kontraktile Sarkomeren. Die Sarkomere enthalten u.a. Troponinkomplexe, bestehend aus Troponin, Aktin und Tropomyosin. Bei einer geringen Ca^{2+} -Konzentration blockiert das Tropomyosin die myosinbindenden Zentren des Aktins. Nach der Öffnung der Ryanodinrezeptoren steigt die Ca^{2+} -Konzentration im Sarkoplasma und die Ionen binden an das Troponin. Die resultierende Konformationsänderung des Komplexes führt zu einer Verlagerung des Tropomyosins und zur Aufhebung der Blockierung von Myosinbindungsstellen im Aktin. Die Bindung des Aktin- und Myosinfilaments findet über bewegliche Myosinköpfe statt. Jeder Kopf bindet ein Molekül ATP in Form von Mg^{2+} /ATP-Komplexen. Nach der Spaltung von ATP in ADP und Phosphat (P_i) erfolgt die Bindung des Myosinkopfes an das Aktinfilament. Anschließend führt die Abspaltung von Phosphat (P_i) zur Drehung des Myosinkopfes um ca. 50° , wodurch eine Gleitbewegung des Aktinfilamentes hinein in das Sarkomer stattfindet (Abbildung 1C). Die Folge ist eine Verkürzung der kontraktile Einheit. Nachdem auch das ADP vom Myosinkopf gelöst ist, kann erneut ATP binden. Erst diese Bindung führt zur Freisetzung des Myosinkopfes vom Aktinfilament. Bleibt die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration weiterhin hoch, kann der Querbrückenmechanismus noch mehrmals wiederholt werden und die Filamente gleiten weiter ineinander. Sowie sich die Ryanodinrezeptoren schließen und Calciumpumpen (SERCA) die Ionen wieder ins SR pumpen, dissoziieren auch die Ca^{2+} -Ionen vom Troponin und die Myosinbindungsstellen im Aktin werden erneut durch das Tropomyosin blockiert (Abbildung 1D). Die Filamente befinden sich in der Ausgangsposition, der Muskel ist entspannt.

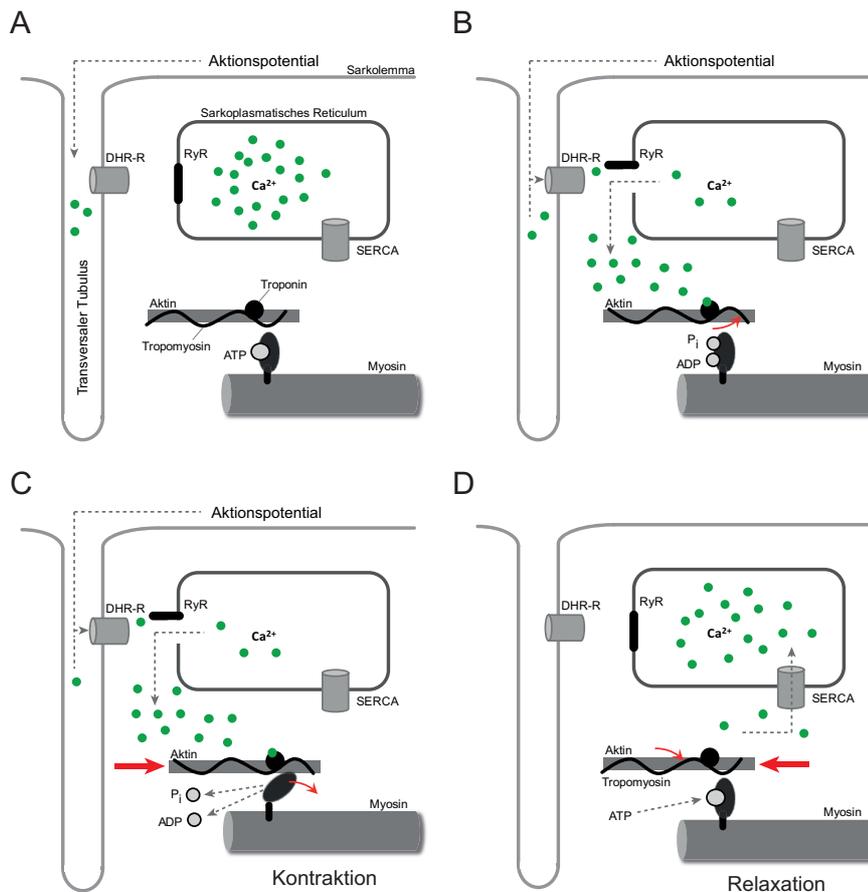


Abbildung 1.: Zyklus der Herzmuskelkontraktion. (A) Im Ruhezustand blockiert Tropomyosin die Myosinbindungsstellen im Aktin. (B) Ein Aktionspotential läuft entlang des T-Tubulus und führt zur Öffnung von Dihydropyridinrezeptor (DHPR)-abhängigen Calciumkanälen. Der Ca^{2+} -Einstrom öffnet die Ryanodinrezeptoren (RyR) des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Troponin führt zu einer Verlagerung des Tropomyosins und somit zur Freilegung der Myosinbindungsstellen. ATP wird in ADP und Phosphat (P_i) gespalten. (C) Nach der Abspaltung von Phosphat und ADP dreht sich der Myosinkopf um 50° , wodurch die Aktin- und Myosinfilamente ineinander gleiten. Der Muskel kontrahiert. (D) Ca^{2+} -Ionen werden durch Ca^{2+} -Pumpen (SERCA) zurück ins SR gepumpt. Bindet ATP an den Myosinkopf, löst sich der Kopf vom Aktinfilament. Bei einer sinkenden Ca^{2+} -Konzentration dissoziieren das Calcium vom Troponin und Tropomyosin blockiert erneut die Myosinbindungsstellen im Aktin. Der Muskel entspannt. (Verändert nach Eckert, 2002 und Clauss und Clauss, 2006)

1.3. Der Zebrafisch als Modellorganismus für die Herzforschung

Im letzten Jahrzehnt ist der Zebrafisch (*Danio rerio*) zu einem beliebten Modellorganismus für die Erforschung der Vertebratenentwicklung geworden und konnte zur Aufklärung der Herzmorphogenese sowie zur Untersuchung pathologischer Entwicklungen im Herzen beitragen. Der Zebrafisch gehört zu den *Teleostei* (Knochenfische) und verbindet die Vorteile der einfachen Haltung und genetischen Manipulation auf der Basis eines Wirbeltieres. Auf Grund der Homologien zum Menschen können somit Erkenntnisse über grundlegende Entwicklungsprozesse auf Säugetiere wie den Menschen übertragen werden.

Die Vorteile des Zebrafischs liegen vor allem in der optischen Transparenz der Embryonen, wodurch die externe Embryogenese visuell dokumentiert werden kann (Kimmel et al., 1995). In Kombinationen mit den neusten Mikroskopieverfahren und transgenen Fischen, die sich durch eine gewebespezifische Expression von Fluoreszenzsignalen auszeichnen, bietet der Zebrafisch ein optimales Modell für bildgebende Studien. Des Weiteren kann der Zebrafisch für die Analyse von Mutationen mit Hilfe von genetischen Techniken eingesetzt werden. Mit Hilfe der Methode der sog. *Forward Genetics* wird ein Phänotyp untersucht, der auf Grund zufälliger Mutagenese entstanden ist. Im Gegensatz dazu wird mit der sog. *Reverse Genetics* gezielt die Funktion eines Genes studiert, z.B. durch die Verwendung einer Morpholino-basierender Geninaktivierung (*knockdown*).

Besonders für Studien der embryonalen Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems empfehlen sich die Zebrafische. Auch bei einer fehlerhaften Ausprägung des Kreislaufs ohne Blutzirkulation können sich die Fische vollständig entwickeln, da infolge der geringen Größe der Embryonen das Gewebe durch passive Diffusion versorgt wird (Bakkers, 2011). Daher kann eine gezielte Veränderung der Genexpression während der Herzmorphogenese durchgeführt und die defekte Entwicklung studiert werden. Weitere, relevante Vorteile des Zebrafisches für die Herzforschung liegen in der Homologie zu den Säugetieren (Scott und Yelon, 2010), da u.a. die Ausbildung der Herzklappen vergleichbar mit denen der Säuger ist. Die Gene zur Steuerung der Herzentwicklung liegen in Zebrafischen und Säugern konserviert vor. Ein wesentlicher Unterschied zu den Säugern liegt in der Fähigkeit zur Herzregeneration. Die Charakterisierung der regenerativen Prozesse im Zebrafisch würde helfen, die Reparaturprozesse im geschädigten Herzgewebe des Menschen aufzuklären.

Um die grundlegenden Entwicklungsprozesse im Zebrafisch auf der Ebene der Proteinexpression zu studieren, erfolgte in den letzten Jahren die verstärkte Anwendung massen-

spektrometrischer Analysen. Die ersten Studien zur globalen Identifikation von Proteinen während der embryonalen Entwicklung wurden von Tay et al. (2006) und Lucitt et al. (2008) veröffentlicht, um das embryonale Proteom zu verschiedenen Zeitpunkten zu charakterisieren. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese kombiniert mit der massenspektrometrischen Analyse konnten 108 bzw. 789 Proteine identifiziert werden. Anschließend wurde in weiterführenden Studien der Fokus auf posttranslationale Proteinmodifikationen (PTM) gelegt. Um aktive Signalwege während der embryonalen Entwicklung zu studieren, wurde die endogene Phosphorylierung von Proteinen in Embryonen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach der Befruchtung (*hours post fertilization*, hpf) mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) untersucht (Lemeer et al., 2008b). Dabei konnte die Aktivität der Kinasen Cdk5, p38-MAPK, PKA und der Casein Kinase 2 belegt werden. Des Weiteren wurde der Einfluss glykosylierter Proteine während der Entwicklung studiert (Baycin-Hizal et al., 2011). Zum Zeitpunkt 48 hpf konnten mit Hilfe der MS 169 Proteine mit Glykosylierung detektiert werden, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuronaler und muskulärer Strukturen spielen. Proteinstudien basierend auf der Massenspektrometrie können daher gut für den Modellorganismus Zebrafisch angewendet werden, um Entwicklungsprozesse auf der Ebene der Proteinexpression zu charakterisieren. Des Weiteren können auch regenerative Prozesse im Zebrafisch dokumentiert werden. In der Studie von Saxena et al. (2012) wurde mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese und der massenspektrometrischen Analyse die Regulation von Proteinen während der Flossenregeneration beschrieben. Zukünftig werden globale Proteinstudien im Zebrafisch vielfach Anwendung finden, u.a. für die Charakterisierung der embryonalen Entwicklung und regenerativer Prozesse sowie für die Aufklärung pathogener Phänotypen.

1.4. Embryonale Entwicklung im Zebrafisch

1.4.1. Überblick der Embryogenese im Zebrafisch

Die hier beschriebenen, embryonalen Entwicklungsschritte wurden aus Kimmel et al. (1995) zusammengefasst. Nach der Befruchtung der Eizellen findet die embryonale Entwicklung extern und unter optimalen Bedingungen bei 28,5°C statt. Etwa drei Stunden nach der Befruchtung (*hours post fertilization*, hpf) hat sich die Zygote mehrfach in ca. 1000 Zellen, den Blastomeren, geteilt, die durch maternale Nährstoffe des Dottersacks versorgt werden. Die Morphogenese des Embryos beginnt nach 4 hpf mit der Entstehung des Epiblasten.

Dabei handelt es sich um eine dünne Zellschicht, die 30% des oberen Dottersacks bedeckt. Während der Gastrulation (5 - 10 hpf) beginnt die Entwicklung einer zweiten Zellschicht, der Hypoblast. Somit besteht der Embryo aus zwei Zelllagen: dem äußeren Epi- und dem inneren Hypoblast, dessen Zellen sich während der Gastrulation zum Mesoderm und Endoderm differenzieren. Außerdem finden während der Gastrulation konvergente Extensionsbewegungen der Zellen statt, die aus der Blastula einen strukturierten, aus mehreren Zelllagen bestehenden Embryo mit einer antero-posterioren (A-P) Körperachse bilden. In der anschließenden Phase der Segmentierung (10 - 24 hpf) beginnt die Morphogenese rudimentärer Organanlagen, die Somiten werden gebildet und der Embryo verlängert sich entlang der A-P Körperachse. Nach 22 hpf beginnen die ersten Kontraktionen des Herzens. Die Phase der Pharyngula findet zwischen 24 und 48 hpf statt und wird durch die Ausbildung der sieben Kiemenbögen (*pharyngeal arches*) charakterisiert. Aus zwei Bögen bilden sich die Anlagen der Kiefer, aus den restlichen die Kiemen. Des Weiteren streckt sich der Embryo, spontane Kontraktionen der Skelettmuskeln werden häufiger und die Pigmentierung der Augen und des Körpers beginnt. Nach 48 hpf ist die Morphogenese der Organe weitgehend abgeschlossen. Zwischen 48 und 72 hpf schlüpft der Embryo aus dem Chorion und beginnt mit dem Aufblähen der Schwimmblase. Nach 120 hpf sind die Energiereserven des Dottersacks aufgebraucht und der Embryo beginnt mit der selbstständigen Ernährung.

1.4.2. Herzentwicklung: Spezifizierung und Differenzierung der kardialen Vorläuferzellen

Multipotente myokardiale Vorläuferzellen konnten bereits während des frühen Blastulastadiums (256 bis 512 Zellen) detektiert werden (Stainier et al., 1993). Die Zellen befinden sich an der ventrolateralen Marginalzone zwischen Dottersack und Blastula und sind noch nicht in ventrikuläre bzw. atriale Vorläuferzellen differenziert. Im Midblastula-Stadium (1000 - 2000 Zellen, 5 hpf) erfolgt die Differenzierung in zwei Subpopulationen, die bilateral entlang der Marginalzone lokalisiert sind (Keegan et al., 2004) (Abbildung 2A). Atriale Herzvorläuferzellen sind ventral ausgerichtet, wohingegen sich ventrikuläre Vorläuferzellen näher an der Marginalzone befinden. Die Lokalisation der endokardialen Vorläuferzellen zeigt dagegen keine höhere Ordnung.

Nach der Wanderung der Herzvorläuferzellen ins laterale Mesoderm, wird die myokardiale Differenzierung im 12-Somiten-Stadium (15 hpf) induziert (Yelon et al., 1999). Die Vorläuferzellen sind medial-lateral lokalisiert und können auf Grund der Expression der Pro-

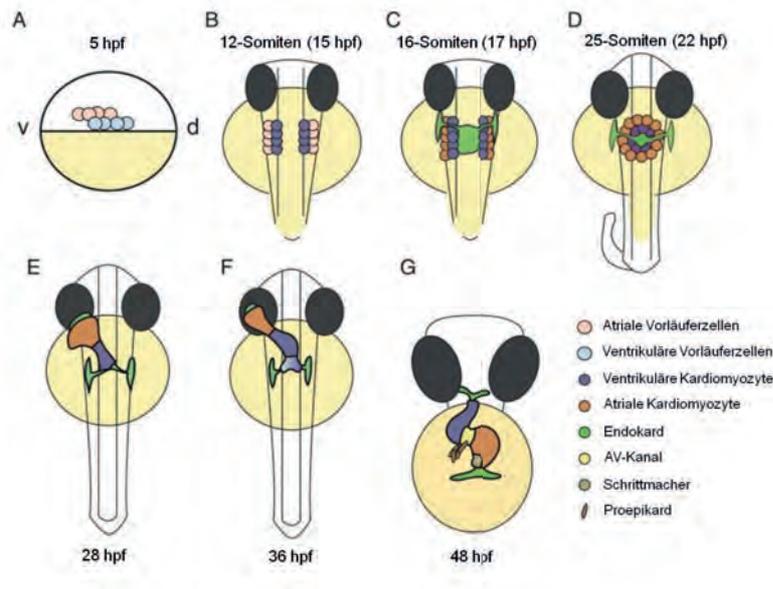


Abbildung 2.: Stadien der embryonalen Herzentwicklung. (A) Zum Zeitpunkt 5 hpf bedeckt die Blastula (weiß) etwa 50% des Dottersacks (gelb). Die Herzvorläuferzellen befinden sich an der Marginalzone, wobei atriale Vorläuferzellen (pink) ventral ausgerichtet sind. (B) Im lateralen Mesoderm beginnt im 12-Somiten-Stadium die Differenzierung der Herzvorläuferzellen zu Herzmuskelzellen. (C) Endokardiale Vorläuferzellen (grün) wandern in Richtung der embryonalen Mittellinie. Weiterhin findet die myokardiale Differenzierung der bilateralen Zellpopulationen zu atrialen (orange) und ventrikulären (dunkelblau) Myozyten statt. (D) Im 25-Somiten-Stadium wandern die bilateralen Zellpopulationen in Richtung Mittellinie und fusionieren zu einer ringförmigen Struktur, wobei endokardiale Zellen das Zentrum bilden. (E) Während der Herzmorphogenese nach 22 hpf formt sich der primitive Herzschlauch aus, dessen inneres Lumen mit endokardialen Zellen ausgekleidet wird. (F) Nach 36 hpf beginnt der kardiale Looping-Prozess mit der partiellen Verdrehung des Herzschlauchs, bis das Herz eine S-förmige Struktur besitzt. (G) Nach 48 hpf bildet sich eine zusätzliche, kardiale Zellpopulation, das Proepikard. Diese Zellen bilden später das Epikard aus. (Verändert nach Bakkers, 2011)

teine *ventricle myosin heavy chain* (*vmhc*) (mediale Orientierung) und *atrial myosin heavy chain* (*myh6/amhc*) (laterale Orientierung) eindeutig voneinander unterschieden werden (Abbildung 2B). Die Differenzierung in ventrikuläre und atriale Myozyten erfolgt bis zum 26-Somiten-Stadium (22 hpf) und wird durch verschiedene Signalwege koordiniert. *Bmp* (*bone morphogenetic protein*), *Fgf* (*fibroblast growth factor*) und der Nodal-Signalweg regulieren die Expression zentraler Transkriptionsfaktoren (*Nkx2.5*, *Gata5* und *Hand2*), welche die myokardiale Differenzierung einleiten und steuern (Reiter et al., 2001; Keegan et al., 2004; Yelon et al., 2000). Des Weiteren regulieren auch repressive Signale die kontrollier-

te Differenzierung der Herzvorläuferzellen. Retinolsäure begrenzt die Anzahl myokardialer Vorläuferzellen (Keegan et al., 2005) und der Wnt-Signalweg die Spezifizierung der Zellen (Ueno et al., 2007). Das detaillierte Zusammenspiel aller Faktoren während der Spezifizierung und Differenzierung der Herzvorläuferzellen ist bisher noch unklar.

1.4.3. Herzentwicklung: Ausbildung des Herzschauchs und Kammerbildung

Im 14-Somiten-Stadium (16 hpf) finden parallel zu den myokardialen Differenzierungen innerhalb des Herzfeldes auch Wanderungsbewegungen der bilateralen Zellpopulationen in Richtung der embryonalen Mittellinie statt (Abbildung 2C und D). Während der kardialen Fusion nähern sich beide Zellpopulationen einander an, bis sie eine ringförmige Struktur bilden. Da endokardiale Zellen bereits zu einem früheren Zeitpunkt in Richtung Mittellinie gewandert sind (Holtzman et al., 2007), bilden sie nun das Zentrum umschlossen von einem Ring ventrikulärer Zellen. Atriale Vorläuferzellen bilden die Peripherie (Abbildung 2D). Nach 22 hpf (25-Somiten-Stadium) beginnt die Rotation und die Verlängerung des myokardialen Gewebes und somit die Ausbildung eines schlauchförmigen Herzens. Die nun asymmetrisch verlaufende Herzmorphogenese wird durch die heterogene Expression der Wachstumsfaktoren Bmp und Nodal im lateralen Mesoderm bestimmt. Ventrikuläre Zellen befindet sich nun posterior zu den atrialen Zellen (Abbildung 2E). Von der zentralen Position aus beginnen Wanderungsbewegungen der endokardialen Zellen, um das innere Lumen des schlauchförmigen Herzens auszukleiden (Rohr et al., 2008).

Zwischen 24 - 48 hpf findet der Übergang vom primitiven Schlauchherz zu einem Pumporgan mit zwei Kammern statt. Der kardialer *Looping*-Prozess beginnt 36 Stunden nach der Befruchtung mit der Verschiebung des Ventrikels auf die rechte Seite der embryonalen Mittellinie, was eine partielle Verdrehung des Herzschauchs zur Folge hat. Zusätzlich erfolgt die Einschnürung zwischen Atrium und Ventrikel an der Position des zukünftigen AV-Knotens (Abbildung 2F und G). Anschließend findet die Morphogenese der AV-Klappen statt. Eine spezifische Genexpression im AV-Endokard von *notch1b* und ALCAM (DM-Grasp) konnte in diesem Zusammenhang beschrieben werden (Beis et al., 2005). Mit der Expression von ALCAM geht die Veränderung der Zellform endokardialer Zellen des AV-Knotens einher. Die schuppenförmigen Zellen nehmen eine kubische Form an und aggregieren. Zum Zeitpunkt 48 hpf kleiden die ALCAM-positiven Zellen den AV-Knoten aus und bilden Ausbuchtungen, aus denen sich die Herzklappen bilden.

Die ersten, noch unregelmäßigen Kontraktionen des Herzens können nach 22 hpf im

primitivem Schlauchherz detektiert werden. Mit fortschreitender Herzmorphogenese findet dann die Weiterentwicklung von einfachen, peristaltischen Kontraktionen hin zu sequenziellen Kontraktionen des Atrium und Ventrikels und einem unidirektionalen Blutstrom statt.

Bis zu diesem Zeitpunkt in der embryonalen Herzentwicklung besteht die Herzwand nur aus zwei Zellschichten, dem Myokard und Endokard. Das Epikard, welches die Außenseite des Myokards überspannt, entwickelt sich erst nach 48 hpf aus einer zusätzlichen kardialen Zellpopulation, dem Proepikard. Die Zellen sind auf der Ventrikelwand in der Nähe des AV-Knoten lokalisiert (Abbildung 2G) und breiten sich nach 72 hpf über die myokardiale Fläche aus, um das Epikard zu bilden (Liu und Stainier, 2010). Nach 120 hpf ist das Herz vollständig entwickelt und ausgereift.

1.5. ALCAM - ein wichtiger Faktor für die Herzentwicklung im Zebrafisch

Für das *activated leukocyte cell adhesion molecule* (ALCAM) wurde eine spezifische Expression im AV-Endokard während der embryonalen Herzentwicklung in Zebrafischen beschrieben (Beis et al., 2005) (Kapitel 1.4.3). Parallel zur Expression von ALCAM findet in diesen Zellen auch eine Veränderung der Zellform statt. Allerdings konnte bisher nicht belegt werden, ob die Zelltransformation ein direkter Effekt der ALCAM-Expression ist.

ALCAM ist ein Transmembranprotein der Immunoglobulin-Superfamilie und wurde als Ligand des humanen CD6-Antigens in Leukozyten beschrieben (Bowen et al., 1995). Homologe Proteine des humanen ALCAMs wurden auch in anderen Arten wie Hühnern (BEN/DM-GRASP, Burns und MacRae, 2006), in Nagetieren (KG-CAM, Peduzzi et al., 1994) (ALCAM/CD166, Bowen et al., 1997) und im Zebrafisch (Neuroilin/ALCAM, Kanki et al., 1994) entdeckt. Für ALCAM konnten bisher vielfältige Funktionen beschrieben werden, u.a. während der Zelladhäsion, der neuronalen Entwicklung, der Immunantwort und der Tumorbildung (Ofori-Acquah und King, 2008). Des Weiteren scheint ALCAM relevant für die Herzentwicklung zu sein. In Mäusen wurde die Expression von ALCAM in frühen Entwicklungsstadien des Herzens dokumentiert (Hirata et al., 2006) und im Kralenfrosch führt der Verlust von ALCAM zu einer defekten Herzmorphogenese (Gessert et al., 2008). Auch im Zebrafisch ist ALCAM an verschiedenen Entwicklungsprozessen beteiligt. Ein Morpholino-basierender *knock down* von ALCAM in Zebrafischen führt zu einer unvollständigen Entwicklung der Augen und des Herzens (Diekmann und Stuermer,

2009) sowie zur fehlerhaften Entwicklung des Knorpelgewebes und der Schwimmblase (Choudhry et al., 2011). Die exakte Funktionsweise von ALCAM ist bisher unbekannt. Es wird vermutet, dass ALCAM eine Verbindung zwischen extrazellulären Rezeptoren und dem intrazellulären Cytoskelett aufbaut, wodurch es die Regulation der Zellform beeinflussen kann (Zimmerman et al., 2004).

1.6. Adaptive Prozesse während der Herzalterung

Neben den entwicklungsbiologischen Fragestellungen spielt auch die Seneszenz eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung des Herzproteoms. Während eines Lebensalters müssen die Kardiomyozyten auf verschiedene Einflüsse wie körperliche Aktivität oder Krankheit reagieren, um ihre Funktion auszuführen. In den letzten einhundert Jahren wurde angenommen, dass Herz bestehe aus postmitotischen Zellen. Die Kardiomyozyten, die zum Zeitpunkt der Geburt vorliegen, würden somit ein lebenslang fortbestehen und die Pumpfunktion des Herzens gewährleisten. Ein Paradigmenwechsel in der Erforschung des Herzmuskels änderte jedoch das Bild über die adaptiven Prozesse während der Alterung und pathologischer Ereignisse.

Die biologische Alterung des Herzens wird charakterisiert durch eine progressive Reduktion ventrikulärer Kardiomyozyten (Olivetti et al., 1991). Wie bereits in Kapitel 1.2.4 beschreiben, besteht das adulte Herz größtenteils aus hochspezialisierten Komponenten ausdifferenzierter Kardiomyozyten. Aktuell wird nun kontrovers diskutiert, ob alte und beschädigte Zellen kontinuierlich gegen neue ausgetauscht werden, um die Funktionalität des Herzens aufrechtzuerhalten. Basierend auf der Inkorporation von ^{14}C in das Genom der Kardiomyozyten wurde das Alter und somit die Umsatzrate der Zellen in 12 Probanden bestimmt (Bergmann et al., 2009). In einem Alter zwischen 25 und 75 Jahren sank die Rate neugebildeter Kardiomyozyten von 1% auf 0,45%, was einer Erneuerung von nur 50% der Zellen während einer gesamten Lebensspanne entspricht. Im Gegensatz dazu wurde in der Studie von Kajstura et al. (2010) anhand von Seneszenz- und Apoptose-Marker die Umsatzrate der Kardiomyozyten von 74 Probanden in einem Alter zwischen 19 und 104 Jahren bestimmt. Mit zunehmendem Alter konnte eine erhöhte Synthese der Kardiomyozyten beschrieben werden, welche zu einer Erneuerung aller Zellen bis zu 15 mal bei Frauen und 11 mal bei Männern während eines Lebensalters führt.

Dieser hohe Grad der Kardiomyogenese wird durch die Existenz von multipotenten, kardialen Stammzellen (*cardiac stem cells*, CSC) erklärt, die sich in Kardiomyozyten, Endo-

thelzellen, in glatte Muskelzellen und Fibroblasten differenzieren können (Beltrami et al., 2003). Auf Grund von asymmetrischer Zellteilung dieser Vorläuferzellen entsteht eine Subpopulation proliferierender Kardiomyozyten im Herzen (Beltrami et al., 2001), die nicht vollständig differenziert sind und die Fähigkeit zur Teilung und zur Differenzierung besitzen (Jensen und Watt, 2006).

Dennoch geht mit der Alterung ein Verlust kontraktiler Kardiomyozyten einher, der zu altersbedingten Myopathien führt. Demzufolge sind auch die herzspezifischen Stammzellen der Seneszenz ausgeliefert und beeinflussen den Alterungsprozess maßgeblich. Auf Grund der zunehmenden Schädigung der DNA und der Verkürzung der Telomere sowie durch die Anreicherung funktionsloser Makromoleküle wie Proteine und Lipide werden die CSC in ihrer Funktion eingeschränkt (Mohsin et al., 2011). Die somit verringerte Neusynthese proliferierender Kardiomyozyten führt zu einer geminderten Kapazität, das Myokard zu erneuern. Des Weiteren werden altersspezifische Defekte wie verkürzte Telomere an die Kardiomyozyten übertragen, wodurch Herzmuskelzellen mit einem seneszenten Phänotyp entstehen (Mohsin et al., 2011). Auf Grund der Akkumulation dieser alten, nur schwach kontrahierenden Kardiomyozyten wird die Struktur und Funktion des Herzens maßgeblich beeinträchtigt.

Neben den herzspezifischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen erfahren auch die Kardiomyozyten mit dem Alter eine Verkürzung der Telomere. In beiden Zelltypen wird dadurch die Expression von Zellzyklusinhibitoren wie $p16^{INK4a}$ und $p53$ induziert, die zu Apoptose und Nekrose führen. Des Weiteren nimmt das Volumen einer Kardiomyozyte im Verlauf der Alterung zu, die Folge ist eine verringerte Zellfunktion und ein beeinträchtigter Calciummetabolismus (Lakatta, 2003).

Das Zusammenspiel seneszenten Vorläuferzellen und seneszenten Kardiomyozyten führen zum Verlust funktionsfähiger Muskelzellen sowie zur Akkumulation beeinträchtigter Zellen, wodurch die Physiologie des Herzmuskel stark beeinträchtigt ist und altersbedingten Myopathien entstehen. Die detaillierten, zellulären Abläufe sind allerdings noch unklar.

1.7. Cardiomics: Integrative Studien von Kardiomyozyten auf Transkript- und Proteomebene

Um die zellulären Veränderungen des Herzgewebes transgener Organismen, kardialer Fehlfunktionen oder der embryonale Entwicklung zu untersuchen, können verschiedene Methoden angewendet werden. Eine weitverbreitete Methode, um Veränderungen in der Genex-

pression zu studieren, ist der Microarray. Untersuchungen von transgenen Mausmodellen in Kombination mit globalen Transkriptomanalysen sind hilfreich, um die Genexpression z.B. während der Herzmorphogenese aufzuklären. Anwendung fand die Technik bei der Charakterisierung von Herzvorläuferzellen (Masino et al., 2004) oder um die herzspezifische Genexpression von transgenen Mäusen und Wildtyp-Mäusen miteinander zu vergleichen, z.B. um die Interaktionspartner eines Proteins nach dem *knockout* des entsprechenden Gens zu identifizieren. Mit Hilfe moderner Sequenzierungsmethoden (*next-generation sequencing*, NGS) ist es ebenfalls möglich, die globale Genexpression umfassend und schnell zu studieren. In der Studie von Hestand et al. (2010) konnte mit dieser Methodik die transkriptionelle Regulation während der Myogenese anhand von C2C12-Myoblasten untersucht werden.

Microarray-basierende Studien beschreiben die Transkriptebene einer Zellen bzw. eines Gewebes. Parallele Transkript- und Proteinanalysen haben allerdings gezeigt, dass durch prä- und posttranslationale Modifikationen oft unterschiedliche Proteine ausgehend von einem Gen kodiert werden (Cox und Mann, 2011). Um die komplexen Veränderungen einer Zelle auf Proteinebene zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren die quantitativen Proteomanalysen basierend auf der Massenspektrometrie intensiv weiterentwickelt. Globale Studien des murinen ventrikulären Proteoms (Bousette et al., 2009) sowie von isolierten Kardiomyozyten (Yin et al., 2010) ermöglichten eine erste, umfangreiche Charakterisierung des Herzmuskels auf Proteinebene. Weitere potentielle Anwendungsbereiche der integrativen Studien auf Proteinebene sind im Bereich der Herzforschung vielfältig (Himeda und Hauschka, 2010). Pathologische Herzphänotypen könnten auf veränderte Proteinexpressionen oder Proteinmodifikationen sowie auf beteiligte Signalwege untersucht werden. Des Weiteren könnten Proteomanalysen zur Aufklärung von Signalwegen herzspezifischer Stammzellen verwendet werden, um die Reparaturprozesse im geschädigten Myokard zu untersuchen. Außerdem würden Studien der globalen Proteinexpression während der embryonalen Entwicklung die Herzmorphogenese weiter aufklären.

1.8. Massenspektrometrie

Für die Analyse komplexer Proteome sind leistungsfähige Massenspektrometer notwendig. Die Entwicklung von hochauflösenden Tandemmassenspektrometern in Kombination mit einer effektiven Probenaufarbeitung ermöglichte eindrucksvolle Proteinstudien. Im folgenden Kapitel soll zunächst eine kurze Einführung über die generelle Funktionsweise eines

Massenspektrometers erörtert werden. Anschließend wird auf die quantitative Proteomanalyse basierend auf der metabolischen Markierung eingegangen.

Die grundlegende Funktion eines Massenspektrometers ist die Detektion des Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von ionisierten Biomolekülen. In der vorliegenden Arbeit wird die Technik zur Analyse komplexer Proteinproben angewendet, wobei die Proteine enzymatisch verdaut und auf der Ebene der Peptide analysiert werden. Mit Hilfe der Massenspektrometrie wird das m/z -Verhältnis der positiv geladenen Peptide (Ionen) bestimmt.

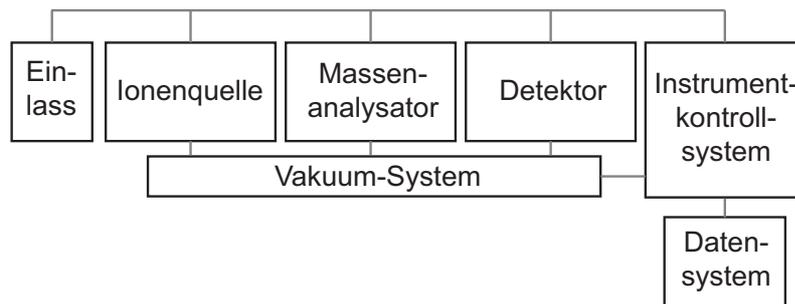


Abbildung 3.: Der schematische Aufbau eines Massenspektrometers als Blockdiagramm. Die grundlegenden Komponenten sind als Blöcke dargestellt. Die Kombination aus den Varianten des Einlass-Systems, der Ionenquelle und des Massenanalysators definieren den Typ des Massenspektrometers. (Verändert nach Kinter und Sherman, 2000)

Das Blockdiagramm in Abbildung 3 zeigt schematisch den grundlegenden Aufbau eines Massenspektrometers (Kinter und Sherman, 2000). Die zu analysierende Probe wird über das Einlass-System entweder direkt oder mittels eines Flüssigchromatographie-Systems (*liquid chromatography*, LC) injiziert. Um die Peptide zu ionisieren und in die Gasphase zu überführen, wird eine Ionenquelle verwendet. Dabei kann es sich um eine Elektrospray-Ionisation (ESI) oder eine Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI) handeln. Die geladenen Peptide (Ionen) werden im Massenanalysator entsprechend dem m/z -Verhältnis aufgetrennt und vom Detektor registriert. Für die Selektion der Ionen stehen verschiedene Massenanalysatoren zur Verfügung, wie der Quadrupol, die Ionenfalle und der Time-of-Flight-(TOF) Massenanalysator. Um den Ionenstrom im elektrischen Feld ungebremst zu navigieren, arbeiten Bereiche der Ionenquelle, der Massenanalysator und der Detektor im Hochvakuum. Das Kontrollsystem überwacht und dokumentiert alle Bereiche des Instrumentes. Das Datensystem speichert die generierten Rohdaten sowie einzelne Parameter des Kontrollsystems.

Die jeweilige Kombination der einzelnen Varianten des Einlass-Systems, der Ionenquelle und des Massenanalysators definieren den Typ eines Massenspektrometers und somit die Eigenschaften des Systems. In der vorliegenden Arbeit wurden die Massenspektrometer LTQ-Orbitrap XL und LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) verwendet. Bei diesen Geräten handelt es sich um Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) bestehend aus einem Massenanalysator, der linearen Ionenfalle (*linear trap quadrupole*, LTQ) und einem Orbitrap-Detektor. Die Probenaufnahme erfolgt über ein Umkehrphasen- (*reverse phase*, RP) Flüssigchromatographie-System (nanoLC-System), das über eine Elektrospray Ionenquelle an das Massenspektrometer gekoppelt ist.

Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) beinhaltet zwei Phasen der Massenanalyse. In der ersten Phase wird das m/z -Verhältnis von geladenen Peptiden (Ionen) detektiert. Einzelne Ionen werden dann ausgehend von der Masse selektiert und fragmentiert, um in der zweiten Phase die m/z -Verhältnisse der Fragmentionen zu bestimmen. Ausgehend von den m/z -Verhältnissen der Fragmentionen kann an Hand von Datenbanken das ursprüngliche Protein identifiziert sowie posttranslationale Modifikationen lokalisiert werden.

1.8.1. Der LTQ-Orbitrap Massenspektrometer kombiniert die Peptidfragmentierung und Detektion

Wie bereits beschrieben, sind die in dieser Arbeit verwendeten LTQ-Orbitrap Massenspektrometer mit einem nanoLC-System und einer Elektrospray Ionenquelle verbunden. Die Peptide eluieren nach der Chromatographie mit steigendem Gehalt eines organischen Lösungsmittels von der RP-C18-Säule. Dabei befinden sich die Peptide in einer wässrigen und sauren (0,5% Essigsäure) mobilen Phase. Durch das Anlegen einer hohen positiven Spannung (2,5 kV) im Bereich der Säulenspitze werden alle basischen Aminosäuren sowie der basische N-Terminus der Peptide protoniert, es entstehen positiv geladene Ionen (Kinter und Sherman, 2000). Die Feldrichtung der Spannung bestimmt dabei die Ladung der Ionen. Durch eine negative Spannung würden negative geladene Ionen erzeugt werden. Im Fall einer proteolytischen Spaltung von Proteinen wird häufig des Enzyms Trypsin verwendet, weshalb eine positive Ionisation angewendet wird. Trypsin hydrolysiert Peptidbindungen spezifisch nach den Aminosäuren Arginin und Lysin. Die entstehenden Peptide besitzen C-terminal eine der beiden basischen Aminosäuren und den basischen N-Terminus. Die Peptide werden daher während der Ionisation unter sauren Bedingungen meist zweifach positiv geladen.

Auf Grund des elektrischen Feldes sammeln sich die positiv geladenen Ionen an der Säulenspitze und bilden einen Taylor-Kegel, aus dem sich einzelne Tropfen lösen (Kinter und Sherman, 2000). Die Tropfen besitzen infolge der sauren Bedingungen ebenfalls eine positive Ladung und bewegen sich im elektrischen Feld in Richtung Gegenelektrode, zum negativ geladenem Eingang des Massenspektrometers. Durch die Verdunstung des Lösungsmittels werden die Tropfen immer kleiner, bis die Abstoßung der positiven Ladungen zu groß wird und die Tropfen in kleinere Tröpfchen zerfallen. Schließlich treten die geladenen Peptide in die Gasphase über und werden in das Massenspektrometer gelenkt.

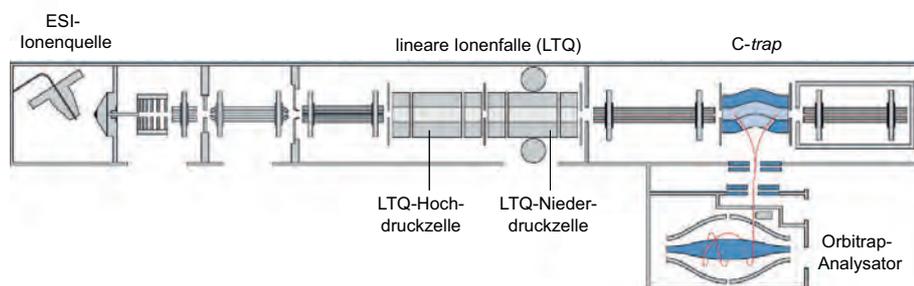


Abbildung 4.: Schematischer Aufbau des LTQ-Orbitrap Velos Massenspektrometers. Nach der Elektrospray-Ionisation (ESI) an der Ionenquelle werden die Ionen durch die lineare Ionenfalle (LTQ) zum Orbitrap geleitet. Durch oszillierende Kreisbewegungen der Ionen um die spindelförmige Elektrode werden die m/z -Verhältnisse der Ionen abgeleitet. Die Ionen mit der höchsten Intensität werden anschließend im LTQ selektiert und fragmentiert, um die m/z -Verhältnisse der Fragmentionen zu messen. (Verändert nach Olsen et al., 2009)

In Abbildung 4 ist ein LTQ-Orbitrap Velos Massenspektrometer dargestellt. Die mittels ESI erzeugten Ionen werden über Linsensysteme ins Vakuum überführt und mittels hochfrequenter Spannung über die lineare Ionenfalle (LTQ) zur C-trap geleitet, einer Ionenfalle in gekrümmter Form (Olsen et al., 2009). Dort werden die Ionen abgebremst und komprimiert zum Orbitrap-Detektor überführt. Dieser besteht aus einer inneren, spindelförmigen Elektrode und einer äußeren Elektrode. Nach dem Eintritt der Ionen bewegen sie sich im elektrostatischen Feld auf Kreisbahnen um die spindelförmige Elektrode und oszillieren entlang der Längsachse (Makarov et al., 2006). Die Frequenz dieser Bewegung wird durch das m/z -Verhältnis der Ionen bestimmt, welches anschließend mittels einer Fourier Transformation berechnet wird. Der Orbitrap-Detektor detektiert in der ersten Phase der Massenanalyse die m/z -Verhältnisse von positiv geladenen Peptide im sog. *full* MS-Scan

mit sehr hoher Massengenauigkeit und Auflösung. Die Ionen mit der höchsten Intensität werden nun im LTQ isoliert und mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (*collision-induced dissociation*, CID) fragmentiert. Bei einer sog. Top10-Methode werden 10 Ionen des *full* MS-Scans im LTQ isoliert und fragmentiert. Somit wird in der zweiten Phase der Massenanalyse, dem MS/MS-scan, die m/z -Verhältnisse der Fragmentionen im LTQ gemessen. An Hand derer können die ursprünglichen Proteine mittels Datenbanken identifiziert oder posttranslationale Modifikationen bestimmt werden.

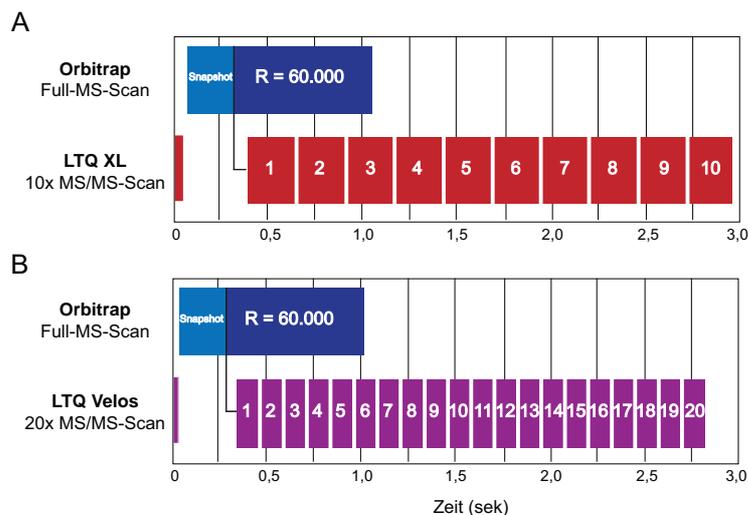


Abbildung 5.: Ein Tandem-MS-Zyklus mit *full* MS-Scan und MS/MS-Scans. Im LTQ-Orbitrap XL erfolgt innerhalb von 3 s eine Top10 CID-Methode. Auf Grund der dualen Ionenfalle des LTQ-Orbitrap Velos Massenspektrometers erfolgt innerhalb der gleichen Zeitspanne die Analyse von 20 MS/MS-Scans. (Verändert nach Olsen et al., 2009)

Im Gegensatz zum LTQ-Orbitrap XL besteht die lineare Ionenfalle des LTQ-Orbitrap Velos aus zwei Zellen. Einer Hochdruckzelle, in der die Ionen selektiert und fragmentiert werden und einer Niederdruckzelle, in der die m/z -Verhältnisse der Fragmentionen detektiert werden (Abbildung 4). Dadurch können beide Prozesse parallel verlaufen, wodurch die Anzahl der Messungen pro Zeiteinheit deutlich erhöht wird. In der Abbildung 5 sind die einzelnen MS- und MS/MS-Scans der beiden Massenspektrometer gegen die Zeit aufgetragen. Der LTQ-Orbitrap XL benötigt für die Top10-Methode etwa 3 Sekunden. Diese Zeitspanne enthält den *full* MS-Scan, für den der Orbitrap eine Sekunde benötigt (blauer Bereich in Abbildung 5) sowie die 10 MS/MS-Scans im LTQ (rote Bereiche in der Abbildung). Im Vergleich dazu schafft der LTQ-Orbitrap Velos in dieser Zeitspanne die Analyse

von 20 MS/MS-Scans und ist daher auf Grund des dualen LTQ doppelt so schnell. Der Orbitrap-Detektor ist in beiden Geräten in etwa baugleich und benötigt daher die gleiche Zeiteinheit für den *full* MS-Scan. Wesentliche Merkmale des LTQ und des Orbitraps liegen in der jeweiligen Massengenauigkeit und Geschwindigkeit. Der Orbitrap-Detektor besitzt mit einer Auflösung von 60.000 eine sehr hohe Genauigkeit, benötigt aber für einen Scan ca. eine Sekunde. Der LTQ-Massenanalysator zeichnet sich dagegen mit einer hohen Geschwindigkeit, aber mit einer geringen Auflösung aus.

1.8.2. Quantitative Proteomics - Metabolische Markierung mit stabilen Isotopen

Im Bereich der Proteomics dient die Massenspektrometrie in erster Linie der Identifikation und der Strukturaufklärung von Proteinen. Eine Quantifizierung wurde erst durch die Entwicklung entsprechender Techniken ermöglicht. Um die relative Abundanz eines Proteins zwischen zwei verschiedenen Proben zu studieren, werden Methoden zur Quantifizierung wie die 2D-Gelelektrophorese, chemische Modifikationen (Boersema et al., 2009) oder metabolische Markierungen angewendet (Walther und Mann, 2010). Grundlegend für die metabolische Markierung von Proteinen ist die Inkorporation von stabilen Isotopen in den aktiven Proteinmetabolismus lebender Zellen (Schoenheimer und Rittenberg, 1935). Weitere Methoden sind dabei die Markierung mit ^{15}N -Stickstoff (Oda et al., 1999) und mit Isotopen-markierten Aminosäuren (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*, SILAC) (Ong et al., 2002).

Bei der SILAC-Methode werden Aminosäuren, die nicht-radioaktive Isotope wie Deuterium (^2H), ^{13}C oder ^{15}N tragen, metabolisch in das Proteom einer Zelle eingebaut (Ong et al., 2002). Bei den Aminosäuren kann es sich dabei um Arginin, Lysin, Leucin oder Valin handeln. Peptide, die mit den sog. schweren Aminosäuren markiert sind, heben sich anschließend im MS-Spektrum von den unmarkierten Peptiden auf Grund eines definierten Massenunterschiedes ab. Als Beispiel ist in Abbildung 6 die Markierung einer Zelllinie mit einem schweren Lysin dargestellt. $^{13}\text{C}_6$ -Lysin (Lysin-6) enthält sechs schwere Isotope des Elements Kohlenstoff. Jedes Isotop besitzt eine Masse von einem Da, wodurch ein schwereres, Lysin-6-haltiges Peptid eine zusätzliche Masse von 6 Da erhält. Dadurch unterscheidet sich dieses Peptid von seinem natürlichen, $^{12}\text{C}_6$ -Lysin- (Lysin-0) haltigem Peptid durch eine Massendifferenz von 6 Da (Ong et al., 2002). Nur durch die Verwendung entsprechender Enzyme für die Proteinspaltung kann die Massendifferenz detektiert werden. Zellen, die

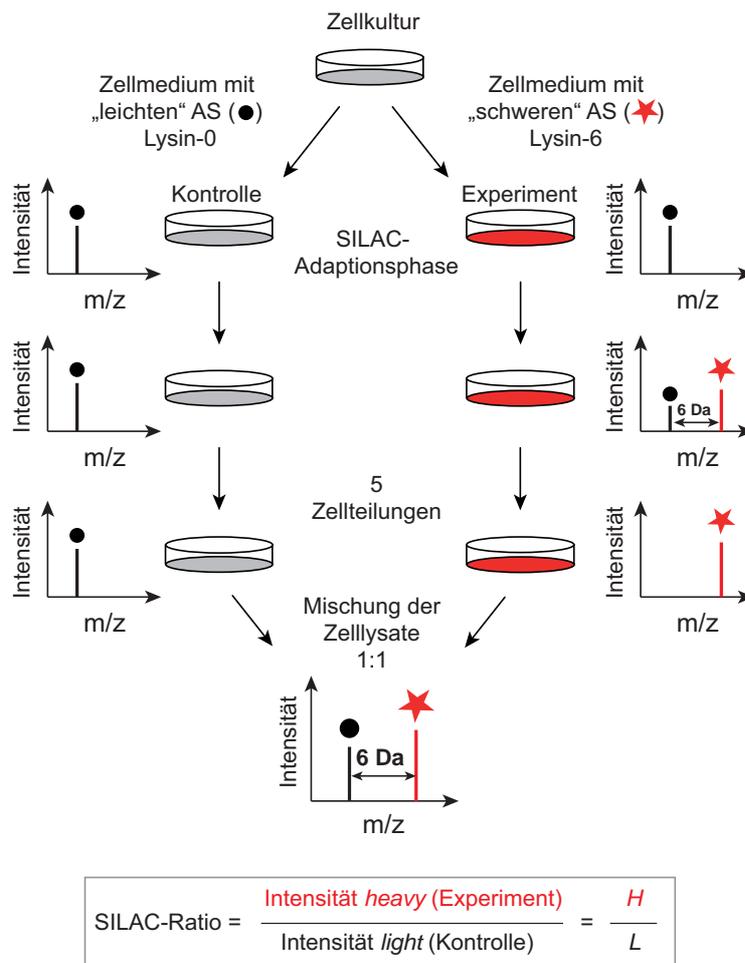


Abbildung 6.: Durchführung eines SILAC-Experimentes. Die Zellen werden in einem Medium mit leichten (Lysin-0) bzw. schweren (Lysin-6) Aminosäuren kultiviert, bis die schwere Zellpopulation das Lysin-6 vollständig inkorporiert hat. Schwere Peptide, die Lysin-6 enthalten (roter Stern), unterscheiden sich von den leichten Peptiden (schwarzer Punkt) durch eine Massendifferenz von 6 Da. Um die Proteinexpression beider Zellpopulationen zu vergleichen, werden leichte und schwere Zelllysate in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und massenspektrometrisch analysiert. Basierend auf den Intensitäten der Peptidpaare können die relativen Proteinabundanz mittels der SILAC-Ratio bestimmt werden. (Verändert nach Ong und Mann, 2006)

ausschließlich mit Lysin-6 markiert sind, werden mit der Endopeptidase Lys-C verdaut. Das Enzym spaltet Peptidbindungen spezifisch nach Lysin, wodurch Peptide mit nur einem Lysin am C-Terminus entstehen. Bei einer Doppelmarkierung mit einer Kombination aus Arginin und Lysin erfolgt die enzymatische Spaltung vorzugsweise mit Trypsin.

In der Abbildung 6 ist ein typisches SILAC-Experiment dargestellt (Ong und Mann,

2006). Eine Zellkultur, die beispielsweise als Kontrolle dient, wird mit dem leichten Lysin-0 kultiviert. In den MS-Spektren der verschiedenen Zellpassagen werden nur Lysin-0-haltige Peptide detektiert, die als leichtes Signal (*Peak*) dargestellt sind. Die zweite Zellpopulation wird dagegen mit dem schweren Lysin-6 kultiviert und mit jeder Zellteilung ist eine zunehmende Inkorporation der schweren Aminosäure zu beobachten, dargestellt als roter Peak. Nach 5 Zellteilungen liegen die Proteine vollständig markiert (97%) vor.

Um die Proteinexpressionen beider Zellpopulationen miteinander zu vergleichen, werden die Zellen lysiert und die Proteinproben der leichten und schweren Population zu gleichen Anteilen gemischt (Abbildung 6). Jedes Peptid liegt nun in zwei Versionen vor, in der natürlichen, Lysin-0-haltigen und in der schweren, Lysin-6-haltigen Form. Nach dem Mischen der Proben und der massenspektrometrischen Analyse werden die Peptide als Peptidpaare detektiert, die sich durch einen definierten Abstand von 6 Da unterscheiden. Ausgehend von den Intensitäten der leichten (Kontrollprobe) und schweren (Experiment) Peptide kann die relative Proteinabundanz zwischen beiden Proben für jedes detektierte Protein bestimmt werden. Die relative Proteinexpression wird als SILAC-Ratio bezeichnet, welche die Intensität des schweren (*heavy*, H) und leichten (*light*, L) Peptids enthält.

$$\text{SILAC-Ratio} = \text{Intensität } heavy \div \text{Intensität } light = H \div L$$

Die präzise Bestimmung der relativen Proteinabundanz mittels der SILAC-basierenden Quantifizierung beruht auf der Gegenüberstellung der leichten und schweren Version eines Peptides innerhalb einer Probe. Weitere Vorteile der Methode liegen in der einfachen Handhabung und experimentellen Durchführung. Auf Grund der metabolischen Markierung erfolgt die Inkorporation der markierten Aminosäuren sowie die Mischung von schweren und leichten Proben zu Beginn des experimentellen Ablaufs, wodurch Abweichungen durch die Probenaufarbeitung minimiert werden. Weiterhin ist die Interpretation der MS-Spektren im Verhältnis zur Markierung mit Isotopen-haltigen Elementen (z.B. ^{15}N) leicht verständlich, da eine definierte Massendifferenz zwischen den Peptidpaaren vorliegt (Ong et al., 2002).

1.8.3. Metabolische Markierung von mehrzelligen Organismen

Obwohl die Ursprünge der SILAC-Methode in der Markierung von Zelllinien liegen, fand die Technik auch Anwendung zur Markierung mehrzelliger Organismen. Neben Bakterien (Soufi et al., 2010) und Hefen (Gruhler et al., 2005) konnten auch Modellorganismen wie

Mus musculus (Kruger et al., 2008), *Drosophila melanogaster* (Sury et al., 2010) und *Caenorhabditis elegans* (Larance et al., 2011) vollständig markiert werden.

Für die Markierung der Maus wurde die essentielle Aminosäure Lysin in der schweren Variante $^{13}\text{C}_6$ -Lysin gewählt (Kruger et al., 2008). Lysin-freies Mausfutter wurde dafür mit dem schweren Lysin-6 supplementiert, um die Mäuse zu ernähren und zu markieren. Die vollständige Markierung der Tiere erfolgte in der zweiten Filialgeneration (F2) mit einer Inkorporation von Lysin-6 über 96%.

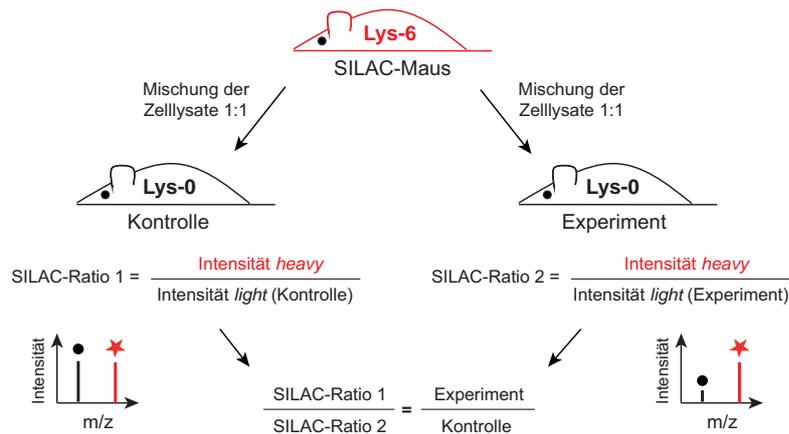


Abbildung 7.: Die SILAC-Maus als interner Standard. Das Zelllysate der schweren SILAC-Maus wird mit unmarkierten Proben einer Kontroll- (z.B. Wildtyp) und einer Versuchsmaus (z.B. *knock-out*) gemischt. An Hand der detektierten SILAC-Ratios können direkte Ratios berechnet werden, um die Proteinexpression der beiden unmarkierten Proben miteinander zu vergleichen. (Verändert nach Kruger et al., 2008)

Im Gegensatz zu der SILAC-Markierung von Zelllinien, bei der zwei Zellpopulationen direkt miteinander verglichen werden, dient die SILAC-Maus als interner Standard für die Proteinquantifizierung. Proteinproben der schweren, Lys-6-markierten Maus werden mit unmarkierten Proben einer Kontroll- und einer Versuchsmaus gemischt. Die schwere Proteine dienen somit als interner Standard, um die beiden leichten Proben miteinander zu vergleichen. Auf diesem Weg können z.B. Unterschiede in der Proteinexpression zwischen Wildtyp- und *knockout*-Mäusen detektiert werden. In der Abbildung 7 ist diese Vorgehensweise dargestellt. Zelllysate der schweren Maus werden zu gleichen Anteilen mit leichten Proben einer Kontrollmaus (z.B. Wildtyp) und einer Versuchsmaus (z.B. *knockout*) gemischt. Infolge der massenspektrometrischen Analyse werden SILAC-Ratios der einzelnen Proteine ermittelt. Wenn für ein Protein eine SILAC-Ratio in beiden Versuchen detektiert

wurde, können beide Ratios (SILAC-Ratio 1 und 2) dividiert werden, um die Expression des Proteins in den beiden leichten Proben miteinander zu vergleichen. Die Wertigkeit des schweren Standards wird dabei eliminiert.

$$\frac{H}{L} (Kontrolle) \div \frac{H}{L} (Experiment) = \frac{Experiment}{Kontrolle}$$

Das Beispiel in Abbildung 7 zeigt ein MS-Spektrum eines Peptidpaares, das zwischen der SILAC-Maus und der Wildtyp-Maus ein 1:1-Verhältnis beschreibt. Das entsprechende Protein wird in beiden Proben vergleichbar exprimiert. Das gleiche Peptidpaar wurde zwischen der SILAC-Maus und der *knockout*-Maus mit einer SILAC-Ratio (H/L -Ratio) von 4:1 detektiert. Die direkte Ratio beträgt somit 0,25. Das Protein wurde um den Faktor 4 in der *knockout*-Maus herunterreguliert. Seit der Etablierung der SILAC-Maus konnte die Genauigkeit der Quantifizierung und die Vielfältigkeit der Methode in mehreren Studien angewendet und belegt werden (Kruger et al., 2008; Walther und Mann, 2011; Drexler et al., 2011).

1.9. Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahrzehnten wurden neue Erkenntnisse über physiologische und molekulare Prozesse im Herzen auf Grund von intensiven Studien z.B. zu entwicklungsbiologischen und pathologischen Sachverhalten erlangt. Anhand von Modellorganismen konnten grundlegende Prozesse wie die Herzmorphogenese oder die Regenerationsfähigkeit von Kardiomyozyten studiert werden. Aktuell steht die Neusynthese von humanen Kardiomyozyten im Fokus und eine eventuelle Regenerationsfähigkeit des humanen Herzens wird kontrovers diskutiert. Weitere Studien, z.B. mit Hilfe der Proteomics, würden zur weiteren Aufklärung von zellulären und molekularen Prozessen der Kardiomyozyten führen, da globale Veränderungen in der Proteinexpression quantifiziert und Signalwege anhand von posttranslationalen Modifikationen (PTM) identifiziert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die Massenspektrometrie-basierende, quantitative Proteinanalyse des Herzens gelegt, um entwicklungsbiologische, regenerations- und altersspezifische Prozesse zu untersuchen. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Erstellung und Etablierung eines neuen SILAC-Modellorganismus: dem SILAC-Zebrafisch. Der Zebrafisch (*Danio rerio*) ist ein beliebtes Modellsystem zur Erforschung der Vertebratenentwicklung, der viele methodische und physiologische Vorteile kombiniert. In der vorliegenden Arbeit sollte der Zebrafisch vollständig mit der Isotopen-gekoppelten Aminosäure

$^{13}\text{C}_6$ -Lysin (Lysin-6) markiert werden. Hierfür sollte ein spezielles Futter entwickelt werden, das ausschließlich die schwere Version des Lysins enthält und die Fische ausreichend versorgt. Um die vollständig markierten Zebrafische anschließend als internen Proteinstandard für quantitative Proteinstudien zu nutzen, sollte eine entsprechende Validierung der Quantifizierung erfolgen.

Mit Hilfe des vollständig SILAC-markierten Zebrafisches sollte eine quantitative Proteomanalyse erfolgen, um herzspezifische Veränderungen während der embryonalen Entwicklung zu studieren. Hierfür sollte die Isolierung embryonaler Herzen für die massenspektrometrische Analyse etabliert werden, um die späte Herzentwicklung zwischen 72 und 120 hpf zu charakterisieren. Im nächsten Schritt sollte die Expression des Proteins *activated leukocyte cell adhesion molecule* (ALCAM) durch eine Morpholino-Injektion im Zebrafisch inhibiert werden, um die Konsequenz eines entwicklungsbiologisch wichtigen Faktors bei der Herzentwicklung zu untersuchen. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der *knockdown* von ALCAM zu einer fehlerhaften Herzentwicklung im Krallenfrosch führt (Gessert et al., 2008), sowie eine verzögerte Differenzierung von retinalen Zellen verursacht, woraus eine unvollständige Augenentwicklung im Zebrafisch resultiert.

Ein weiterer, wichtiger Modellorganismus ist die Maus (*Mus musculus*). Gerade im Bereich der Herz-Kreislaufkrankungen sowie der embryonalen Herzentwicklung konnten im Mausmodell wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Neben den entwicklungsbiologischen Fragestellungen basierend auf dem Zebrafisch standen in der vorliegenden Arbeit auch die Analysen von altersbedingten Veränderungen der Herzfunktion im Vordergrund. Um altersbedingte Adaptionen im Proteom von Kardiomyozyten zu studieren, sollte eine quantitative Proteinanalyse anhand von isolierten Herzmuskelzellen erfolgen. Als interner Standard für die Proteinquantifizierung sollten isolierte Herzen der SILAC-Maus verwendet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien und Materialien

In der vorliegenden Arbeit wurden handelsübliche Chemikalien der folgenden Firmen verwendet: AppliChem, Fluka, Merck, Roth und Sigma-Aldrich. Weitere Chemikalien und Verbrauchsmaterialien werden alphabetisch aufgelistet:

Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit, 30 kDa	Millipore
BSA <i>Protein Standard</i>	Sigma-Aldrich
EMPORE Disk Cartidges-C18	Varian
<i>GlycoBlue</i>	Ambion
<i>Immobiline DryStrip gels</i> pH 3-10	GE Healthcare
<i>IPG Buffer</i> pH 3-10	GE Healthcare
NuPAGE <i>LDS Sample Buffer</i> (4x)	Invitrogen
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen
NuPAGE <i>SDS MOPS Running Buffer</i> (20x)	Invitrogen
<i>SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard</i>	Invitrogen
<i>SC single drop out w/o Lysine</i>	Formedium
Trifluoressigsäure (TFA)	Applied Biosystem
Trizol-Reagenz	Invitrogen

2.2. Chemikalien und Materialien für die Massenspektrometrie

Für die Massenspektrometrie wurden Chemikalien mit hoher Reinheit (*HPLC-grade* oder *MS-grade*) verwendet.

C18-AQ RepoSil-Pur, 3 μm	Dr. Maisch GmbH
Acetonitril	Sigma-Aldrich

Elektrospray Ionenquelle	Proxeon
EMPORE C18 <i>Extraction Disks</i>	3M
Essigsäure	AppliChem
LTQ <i>ESI Positive Ion Calibration Solution</i>	Pierce
LTQ <i>Velos ESI Positive Ion Calibration Solution</i>	Pierce
Methanol	Sigma-Aldrich
PicoTip Emitter, aus Quarzglas	DNU-MS GbR

2.3. Molekularbiologische Kits

<i>Colloidal Blue Staining Kit</i>	Invitrogen
<i>DC Protein Assay</i>	Biorad
<i>GeneChip Zebrafish Genome Array</i>	Affymetrix
<i>ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit</i>	Calbiochem

2.4. Enzyme

Liberase DH	Roche
Lys-C Endopeptidase	WAKO
Trypsin (<i>Sequencing Grade modified</i>)	Promega

2.5. Antikörper

anti-ALCAM (zn-8, Maus)	Hybridoma Bank
anti-Kaninchen IgG (konjugiert mit Alexa 594, Ziege)	Invitrogen
anti- <i>light meromyisin</i> (MF20, Maus)	Hybridoma Bank
anti-Maus IgG (konjugiert mit Alexa Fluor 594, Ziege)	Invitrogen
anti-Muskel-Tropomyosin (CH1, Maus)	Hybridoma Bank
anti-Paralemmen (Kaninchen)	Abcam

2.6. Medien und Agarplatten

M9-Medium (5fach)	Na_2HPO_4	240 mM
	KH_2PO_4	110 mM
	NaCl	42,8 mM
	NH_4Cl	93,5 mM
SILAC-M9-Medium (1fach)	M9-Medium (5fach)	20%
	SC drop out Aminosäuren -Lys	0,25% (w/v)
	Glucose	11,1 mM
	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	2 mM
	CaCl_2	0,2 mM
SILAC-YNB-Medium	YNB ohne Aminosäuren	0,7% (w/v)
	Glucose	2% (w/v)
	SC drop out Aminosäuren -Lys	0,2% (w/v)
Saccharoselösung	Saccharose	200 mM
	Methylparaben	6 mM
	Ampicilin	0,3 mM
E3-Medium	NaCl	5 mM
	KCl	0,17 mM
	CaCl_2	0,33 mM
	MgSO_4	0,33 mM

2.7. Puffer

PBS	NaCl	137 mM
	Na_2HPO_4	10 mM
	KCl	2,7 mM
	KH_2PO_4	1,8 mM

PT	Triton X-100 in PBS	0,3%
PBT	BSA NaN ₃ in PT	4% 0,02%

2.8. Verwendete Geräte

Bioanalyzer 2100	Agilent
Fluoreszenz-Stereomikroskop M205 FA	Leica
FLUOstar <i>galaxy</i>	BMG Labtech
Handhomogenisator Douncer-Typ	Kontes Glas Company
LC 1200 Series	Agilent
LC <i>EASY-nLC</i>	Proxeon
Lyophile <i>ALPHA 1-4</i>	Christ
LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer	Thermo Scientific
LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer	Thermo Scientific
McIllwain <i>Tissue Chopper</i>	Stoelting Company
NanoDrop	Thermo Scientific
OFFgel <i>Fractionator 3100</i>	Agilent
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf
Ultra-Turrax	Ika
Vakuumzentrifuge <i>Concentrator 5301</i>	Eppendorf

2.9. Markierung von Modellorganismen mit $^{13}\text{C}_6$ -Lysin

2.9.1. Markierung von *Escherichia coli*

Um *E. coli* vollständig mit Lysin-6 zu markieren, wurde der lysinauxotrophe Stamm DSM 1099 verwendet. Eine unmarkierte *E. coli*-Kultur wurde in einer Verdünnung von 1:100 in supplementiertem M9-Medium zuzüglich 0,05 g/l Lysin-6 über Nacht bei 30°C und 180 rpm kultiviert (Sambrook et al., 1989). Ausgehend von der ersten Kultur erfolgt eine zweite Vorkultivierung über Nacht unter den gleichen Bedingungen. Mit der zweiten Vorkultur wurden 4 l supplementiertes und Lysin-6-haltiges M9-Medium angeimpft und über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei 5.000 rpm bei 4°C abzentrifugiert, das Sediment mit 20 ml M9-Medium resuspendiert und über Nacht bei -80°C lyophilisiert. Der Ertrag einer 4-Liter-Kultur beträgt ca. 3,1 g (i.Tr.).

2.9.2. Markierung von *Saccharomyce cerevisiae*

Für die Markierung von Hefe mit Lysin-6 wurde der Stamm AH109 verwendet. Hefezellen wurden in YNB-Medium mit 0,03 g/l Lysin-6 inokuliert und über Nacht bei 30°C und 180 rpm kultiviert (Gruhler et al., 2005). Diese Vorkultivierung wurde ausgehend von der jeweils vorherigen Kultur zweimal wiederholt. Anschließend erfolgte die Kultivierung der markierten Hefezellen im großen Maßstab.

2.9.3. Markierung von *Drosophila melanogaster*

Der Wildtypstamm *D. melanogaster* (zur Verfügung gestellt von Prof. Rainer Renkawitz, Institut für Genetik, Justus-Liebig-Universität Gießen) wurde unter vereinfachten Bedingungen bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer kultiviert. Um eine vollständige Markierung der Fliegen mit Lysin-6 zu erreichen, erfolgte die Ernährung mit markierten Hefen (siehe oben). Dafür wurden 200 mg lyophilisierte Hefezellen mit 10 ml Saccharoselösung vermischt und in Kultivierungsröhrchen überführt, welche mit mehreren Lagen dünnem Tissue-Papier ausgelegt wurden (Sury et al., 2010). Nachdem die Fliegen auf die getränkte Unterlage gesetzt wurden, werden die Kultivierungsröhrchen mit einem Stopfen verschlossen. Nach 1 bis 2 Wochen können die Lysin-6-markierten Larven bzw. adulten Fliegen abgesammelt werden.

2.10. Arbeiten mit dem Modellorganismus *Danio rerio*

2.10.1. Aufzucht und Haltung von Zebrafischen

Für die vorliegende Arbeit wurde als Wildtyp die Zebrafischlinie „Bad Nauheim (BNA)“ und die transgene Line *Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* verwendet (D’Amico et al., 2007). Adulte Zebrafische werden nach etablierten Bedingungen bei 28°C gehalten (Westerfield, 2000). Für die Verpaarung werden weibliche und männliche Zebrafische paarweise, aber getrennt, in ein kleines Plexiglasbecken mit durchsichtiger Trennscheibe gesetzt. Am folgenden Tag wird die Trennscheibe gezogen, das Weibchen laicht und das Männchen befruchtet die Eier. Befruchtete Eier werden abgesammelt und für 5 Tage in E3-Medium bei 28°C inkubiert.

2.10.2. Markierung von *Danio rerio* mit ¹³C₆-Lysin

Um den Zebrafisch *D. rerio* vollständig mit Lysin-6 zu markieren, wurde ein spezielles, ¹³C₆-Lysin-haltiges Fischfutter, das sog. „schwere“ Fischfutter, entwickelt. Es besteht aus Lysin-6-markierten *S. cerevisiae*, *E. coli*, Gewebe der SILAC-Maus (Kruger et al., 2008) und SILAC-Mausfutter (Silantes). Von der SILAC-Maus werden verschiedene Gewebe wie Skelettmuskel, Leber, braunes und weißes Fettgewebe verwendet, um eine Grundversorgung an Proteinen und Fettsäuren zu gewährleisten. Das Gewebe wird zerkleinert (McIllwain *Tissue Chopper*), lyophilisiert und mit den übrigen Komponenten in einem Verhältnis (i. Tr.) von 3 (Mausgewebe) : 2 (Mausfutter) : 1 (*S. cerevisiae*) : 1 (*E. coli*) vermischt und homogen gemörsert. Da sich adulte Fische von den Jungtieren, den sog. Larven, durch ihre Größe stark unterscheiden, wurde neben dem grobkörnigen schweren Fischfutter auch ein Jungtierfutter speziell mit kleiner Partikelgröße entwickelt. Dafür werden Lysin-6-markierte Larven von *D. melanogaster* verwendet, da diese ebenfalls reich an Proteine und Fettsäuren sind, aber keine kompakte Gewebestruktur aufweisen. Die Fliegenlarven werden in Flüssigstickstoff gefroren und zu feinem Pulver gemörsert. Anschließend werden sie mit Zellen von *E. coli* und *S. cerevisiae* als auch mit SILAC-Mausfutter in einem Verhältnis (i.Tr.) von 2 (Fliegenlarven) : 2 (*S. cerevisiae*) : 1 (*E. coli*) : 1 (Mausfutter) vermischt und lyophilisiert. Die Zebrafische werden zweimal täglich mit dem schweren Fischfutter gefüttert. Um die Überlebensrate der Jungtiere zu erhöhen, wird in den ersten 6 Wochen einmal wöchentlich mit kommerziellem, nicht markiertem Fischfutter zugefüttert.

2.10.3. Präparation von Organen adulter Zebrafische

Zebrafische werden für die Anästhesie in Wasser mit 0,1% Ethyl-3-aminobenzoat-methansulfonat (Tricain) gesetzt. Anschließend wird ventral die Haut und die darunterliegende Muskulatur beginnend vom Abdomen bis zum Operculum aufgeschnitten und entfernt. Die nun freiliegenden Organe wie Herz, Leber, Milz, Schwimmblase, Darm und die Fortpflanzungsorgane können entnommen werden. Um die Kiemen zu präparieren, wird das Operculum angehoben und die einzelnen Kiemenbögen sauber entnommen. Für die Präparation des Gehirns wird mit einem Skalpell der Kopf unterhalb des Kiemendeckels vom Rumpf abgetrennt. Die Schädeldecke wird vorsichtig geöffnet und das Gehirn entnommen. Aus dem verbleibendem Rumpf können die Flossen und die Skelettmuskulatur präpariert werden. Alle entnommenen Organe werden kurz in kaltem PBS gewaschen und anschließend in Flüssigstickstoff eingefroren.

2.10.4. Isolierung embryonaler Zebrafischherzen

Für die Isolierung embryonaler Zebrafischherzen wurden homozygote Embryonen der transgenen Linie *Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* verwendet. Diese Fischlinie besitzt ein grün fluoreszierendes Herz, da die Expression des GFP (*green fluorescence protein*) unter der Kontrolle des Promotors vom kardialen *myosin light chain 2*-Gen (*cmlc2*; *myl7*) liegt. Embryonen in einem Alter von 72 bzw. 120 hpf werden in Wasser mit 0,1% Tricain anästhesiert, nach einem positiven GFP-Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica M205 FA) sortiert und in einer Petrischale vereinigt. Mittels einer 1,1 mm-Nadel und einer 10 ml-Spritze werden die Embryonen mehrmals auf und ab resuspendiert, um das Herz vom restlichen Embryo abzulösen (Burns und MacRae, 2006). Die vereinzelt GFP-positiven Herzen werden mittels Fluoreszenzmikroskop identifiziert, isoliert und in Flüssigstickstoff eingefroren.

2.10.5. Gezielter *knockdown* der Proteinexpression durch Morpholino

Morpholino *antisense* Oligonukleotide (MO) sind chemisch synthetisierte RNA-Analoga, die hybride Doppelstränge mit komplementärer, einzelsträngiger mRNA bilden. Sie binden im nicht-translatierten Bereich am 5-Ende der mRNA, wodurch das Startcodon der Translation (AUG) blockiert und die Proteinsynthese unterbunden wird. Neben der Blockade der Translation können Morpholinos auch das *splicing* der prä-mRNA blockieren, wodurch ein nicht-funktionales Protein synthetisiert wird.

Die Injektion der Morpholinos erfolgt mit einer dünnen Glaskapillare in befruchtete Oozyten, die sich im Einzell- bzw. Zweizellstadium befinden (Nasevicius und Ekker, 2000). Vom ALCAM-Morpholino, der die Translation der ALCAM-mRNA blockiert (Alc-MO: 5'-TTTATACAGTCCG GCGACAGTCTCA-3') (GeneTools), wurde eine Verdünnung von 1 : 1,6 mit Wasser und Phenolrot angesetzt und 8 ng pro Oozyte injiziert. Um unspezifische Effekte, die durch die Injektion auftreten können, zu dokumentieren, wurde ein Kontroll-Morpholino (K-MO: 5'-CCTCTTACCTC AGTTACAATTTATA-3') (GeneTools) verwendet. Dieser enthält eine zufällige Basensequenz und kann somit an keine mRNA binden. Um die Effizienz des Morpholino-basierten *knockdowns* von ALCAM zu kontrollieren, wurden die Embryonen bei 72 hpf phänotypisch mittels Immunhistochemie analysiert.

2.11. Arbeiten mit dem Modellorganismus *Mus musculus*

2.11.1. Isolierung adulter Maus-Kardiomyozyten

Für die Isolierung von Kardiomyozyten wurden adulte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57 BL/6 in einem Alter von 2, 22 und 30 Monaten sowie der SILAC-Maus mit 2 Monaten verwendet. Die Isolierung basiert auf einer enzymatischen Perfusionsmethode, die nach O'Connell et al. (2007) modifiziert wurde.

Die Narkose der Mäuse erfolgt durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital-Natrium (50 mg/kg Mausgewicht) in physiologischer Kochsalzlösung. Um den Gerinnungsprozess der Thrombozyten zu verhindern, wird den Mäusen zusätzlich Heparin (100 U/ml in PBS) injiziert. Das Herz wird anschließend samt Lunge und Thymus mittels Thorakotomie aus dem Brustkorb entnommen und in eine, mit eiskaltem und calciumfreiem PBS gefüllte Petrischale überführt. Der noch vorhandene Aortenbogen wird vom Thymus und Fettgewebe freigelegt, um eine Kanüle bis zur Aortenklappe einzuführen. Die Lunge sowie restliches Gewebe müssen anschließend entfernt werden. Mit einem Faden wird die Aorta an der Kanüle fixiert und in ein temperiertes (37°C) Perfusionssystem überführt. Kurzzeitig wird das Herz mit calciumfreiem PBS perfundiert, bevor 25 ml Perfusionspuffer hinzugefügt wird, um das Bindegewebe des Herzens zu verdauen und die Kardiomyozyten zu vereinzeln. Während der Perfusion sollte der Durchfluss regelmäßig unter dem Mikroskop auf isolierte Kardiomyozyten geprüft werden. Der Prozess ist abgeschlossen, wenn das Herz langsam transparent erscheint und sich im Durchfluss vermehrt Kardiomyozyten ansammeln. Das Herz wird dann von der Kanüle abgetrennt, in eine kleine Uhrglasschale überführt und

mit 2,5 ml Perfusionspuffer versetzt. Die restliche Aorta sowie Arterien werden sauber abgeschnitten. Das Herz wird mit Hilfe von Pinzetten zerkleinert und vorsichtig mit einer 5 ml-Pipette resuspendiert. Um nun die restliche Enzymaktivität zu hemmen, werden 2,5 ml Stopp-Puffer zugegeben. In einem konische Zentrifugenröhrchen (15 ml) werden mittels der Schwerkraft die Zelltrümmer für einige Minuten sedimentiert, bevor der Überstand, der die intakten Kardiomyozyten enthält, in ein neues Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt wird. Das Pellet wird mit 2,5 ml frischem Stopp-Puffer zugegeben gewaschen, für eine Minute bei 300 rpm sedimentiert und der Überstand mit der vorherigen Zellsuspension vereinigt. Anschließend wird die Suspension durch ein Sieb filtriert (Porengröße 100 μm), um restliche Zelltrümmer und Gewebereste zu entfernen. Die Kardiomyozyten werden bei 800 rpm für eine Minute sedimentiert, mit 2 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und als Zellpellet in Flüssigstickstoff eingefroren.

Perfusionspuffer (25 ml)	Liberase DH	3,5 mg
	Trypsin	3,75 mg
	ad 25 ml calciumfreies PBS	
Stopp-Puffer	CaCl ₂	12,5 μM
	dialysiertes FCS	10%
	in Perfusionspuffer	

2.12. Molekularbiologische Methoden

2.12.1. Gesamt-RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte aus Zebrafischembryonen in einem Alter von 72 hpf. Für die Isolierung wurde die Trizol-Reagenz nach Angaben des Herstellers verwendet. Trizol ist eine monophasische Lösung bestehend aus Phenol und Guanidinisothiocyanat (Chomczynski und Sacchi, 1987), welche die Integrität der RNA während der Homogenisierung des Gewebes aufrechterhält. Durch die Verwendung eines Ultra-Turrax werden die Fischembryonen vollständig in Trizol aufgeschlossen. Die Zugabe von Chloroform und eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 g für 15 min bei 4°C führt zur Phasentrennung der Lösung in eine organische und eine wässrige Phase. Die wässrige, obere Phase enthält die RNA und wird sauber in ein neues Reaktionsgefäß überführt. DNA und Proteine verbleiben in der organischen Phase. Nach der Trennung wird die RNA durch Zugabe von 100% Isopropanol präzipitiert, sedimentiert (12.000g, 10 min, 4°C) und mit 75% Ethanol

gewaschen. Das trockene Pellet wird anschließend in RNase-freies Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA wird durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm ermittelt (NanoDrop).

2.12.2. Genexpressionsanalyse mittels Microarray

Um eine globale Genexpressionsanalyse von Wildtypen und ALCAM-Morphanten durchzuführen, wurden Affymetrix-Microarrays (*GeneChip Zebrafish Genome Array*) verwendet. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte jeweils in Triplikaten. Die praktische Durchführung des Microarrays, welche die Kontrolle der RNA-Integrität, die Markierung der cDNA und die Hybridisierung auf den Chip beinhaltet, erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Die Datenanalyse erfolgte mit RMA und dem Bioconductor (Gentleman et al., 2004) in R und enthielt die Hintergrundkorrektur und Normalisierung der Signale sowie die Zusammenfassung der Daten. Für die Analyse wurde eine entsprechende CDF-Datei von *brainarray* (Sandberg und Larsson, 2007) verwendet, welche die Vereinigung verschiedener *probe*-Sets basierend auf aktuellen Gen-Annotationen mittels RefSeq-IDs durchführt. Um unterschiedlich exprimierte Gene zwischen Wildtyp-Embryonen und ALCAM-Morphanten zu identifizieren, wurde für jedes Gen eine lineare Modellfunktion mittels LIMMA (Smyth et al., 2005) angewendet. Signifikanzwerte (p-Werte) wurden nach angemessenen t-Statistiken ermittelt und durch die *False Discovery Rate* (FDR) korrigiert.

2.13. Proteinbiochemische Methoden

2.13.1. Aufbereitung von Proteinextrakten - Gewebehomogenisierung und Zellyse

Kompaktes Gewebe und Zellen müssen aufgeschlossen, d.h. lysiert werden, um Proteine bzw. Peptide für die massenspektrometrische Analyse zugänglich zu machen. Dieser Prozess kombiniert häufig eine mechanische und eine chemische Behandlung der Zellen. Im ersten Schritt werden die Zell- oder Gewebeproben in einen Detergenz-haltigen Lysispuffer überführt. Detergenzien sind amphipathische Moleküle, d.h. sie bestehen aus einem polaren, hydrophilen Bereich (Kopf) und einem unpolaren, hydrophoben Bereich (Schwanz). Auf Grund dieser chemischen Eigenschaften können sich Detergenzien über hydrophobe Wechselwirkungen zu Aggregaten (Micellen) zusammenschließen, die Integrität von Membranen vermindern und Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen.

Die Zell- oder Gewebeproben werden in SDT-Lysispuffer überführt, welches die Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält (Wisniewski et al., 2009). Über starke hydrophobe Wechselwirkungen sowohl mit der Membran als auch mit Proteinen führt SDS zur Zellyse und zur Denaturierung von Proteinen. Um Gewebeproben vollständig zu zerkleinern und gleichmäßig zu homogenisieren, werden Handhomogenisatoren aus Glas vom Douncer-Typ oder ein Ultra-Turrax eingesetzt. Anschließend werden die Proben für 5 min auf 95°C erhitzt, um eine einheitliche Denaturierung der Proteine zu erreichen. Danach werden die Proben sonifiziert (10 Impulse, 20 % Amplitude, 1 s Impuls, 1 s Pause), wodurch die DNA fragmentiert und die Viskosität der Proben verringert wird. Eine anschließende Zentrifugation bei 16.000 rpm für 5 min führt zur Sedimentation nicht-gelöster Zellbestandteile. Der klare Überstand, der u.a. die gelösten Proteine enthält, wird sauber abgenommen und für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels *DC Protein assay* weiterverwendet.

SDT-Lysispuffer	SDS	4 %
	Tris/HCl pH 7.6	100 mM
	DTT	100 mM

2.13.2. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels *DC Protein assay*

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde in der vorliegenden Arbeit der *DC Protein assay* verwendet. Dieser *assay* beruht auf der Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951) in zwei Reaktionsschritten. Im ersten Schritt erfolgt eine Komplexbildung zwischen Peptidbindungen der Proteine und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung. Nach dieser sog. Biuretreaktion findet eine Reduktion der Folin-Reagenz durch aromatische Aminosäuren statt, die zu einem blauen Farbumschlag führt und durch die Kupfer(II)-Ionen verstärkt wird. Anschließend wird der Absorption bei 750 nm gemessen und die Proteinkonzentration der Proben an Hand einer Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) bestimmt. Die Durchführung des *DC Protein assays* erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.13.3. Proteinfällung mittels Aceton

Liegen die gelösten Proteine im SDT-Puffer vor, erfolgt eine Präzipitation mit Aceton, um die Proteine in einen Harnstoffpuffer zu überführen. SDS überträgt eine negative Gesamt-

ladung auf Proteine und würde einer späteren Protonierung während der Elektrospray-Ionisierung (ESI) entgegenwirken. Um eine vollständige Fällung der Proteine zu erlangen, wird das vierfache Volumen an eiskaltem Aceton hinzugefügt und die Proteine für eine Stunde bei -20°C inkubiert. Für eine bessere Sichtbarkeit des Präzipitats wird $1\ \mu\text{l}$ des Farbstoffes GlycoBlue hinzugefügt. Anschließend werden die präzipitierten Proteine bei 15.000 rpm und 4°C für 10 min sedimentiert, mit 90% Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Aceton wird entfernt und das Proteinpellet getrocknet, bis das restliche Aceton vollständig verdampft ist. Die Proteine werden nun im Harnstoffpuffer gelöst und können proteolytisch verdaut werden.

2.13.4. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels der SDS-PAGE erfolgt die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinauftrennung nach dem diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophoresesystem unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) mittels des NuPAGE-Elektrophoresesystem (Invitrogen) durchgeführt.

Die anionische Detergenz SDS bindet an die Proteine, wodurch einerseits auf die Proteine eine negative Nettoladung übertragen wird und andererseits eine Denaturierung der Proteine (siehe oben) stattfindet. Zuzüglich DDT erfolgt die Reduktion der Disulfidbrücken. Unter diesen Bedingungen binden alle reduzierten Polypeptidketten die gleiche Menge an SDS pro Gewichtseinheit und laufen somit uniform, aber abhängig von ihrem Molekulargewicht durch die Gelmatrix in Richtung Anode. Um Proteine verschiedener Größe (14-200 kDa) gleichmäßig aufzutrennen, wurden NuPAGE Bis-Tris Gradientengele (4-12 % Polyacrylamid) mit NuPAGE MOPS SDS-Laufpuffer verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.13.5. Coomassiefärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte mit dem kolloidalen Farbstoff *Coomassie Blue G250* (Neuhoff et al., 1988). Dieser organische Farbstoff geht nicht-kovalente Bindungen mit basischen Aminosäuren ein. Durch seine kolloidalen Eigenschaften fallen Hintergrundfärbungen im Gel nur sehr schwach aus, da der Farbstoff nicht in das Gel eindringen kann. Ein weiterer Vorteil dieser Färbung liegt in der nicht-kovalenten Bindung zwischen Aminosäuren und Farbstoff, da diese reversibel ist und die Proteine im Gel wieder entfärbt werden können. Somit ist die Coomassiefärbung kompatibel mit einer späteren

massenspektrometrischen Analyse.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Coomassiefärbungen das *Colloidal Blue Staining Kit* (Invitrogen) verwendet. Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

2.13.6. Enzymatische Spaltung von Proteinen in Lösung

Die enzymatische Proteolyse von Proteinen in Lösung (*in solution digest*) erfolgt nach dem Protokoll von Foster und Mann (2005). Im ersten Schritt werden die in Harnstoffpuffer (8M) vorliegenden Proben mit dem Reduktionsmittel DDT versetzt, um eine Reduktion der Disulfidbrücken zu erreichen. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für 30 min mit 1 μg DDT pro 50 μg Protein. Um eine erneute Bildung der Disulfidbrücken durch Oxidation auf Grund des Luftsauerstoffs zu verhindern, werden die freien SH-Gruppen an den Cysteinen chemisch modifiziert. Diese Alkylierung erfolgt durch die Zugabe von 5 μg Iodacetamid pro 50 μg Protein für 20 min bei Raumtemperatur. Die nun einheitlich denaturierten und linearisierten Proteine werden enzymatisch durch die Proteasen Trypsin oder Lys-C gespalten. In beiden Fällen erfolgt ein Vorverdau mit 1 μg Lys-C, welches zur Hydrolyse von Peptidbindungen spezifisch nach Lysin führt. Nach dreistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wird erneut 1 μg Lys-C zugegeben, wenn die Peptidspaltung ausschließlich nach Lysinen erfolgen soll. Um eine Proteinspaltung mit Trypsin durchzuführen, wird die Probe auf 2 M Harnstoff mit ABC-Puffer verdünnt. Anschließend wird 1 μg Trypsin pro 50 μg Protein zugesetzt, wodurch Peptidbindungen nach den Aminosäuren Arginin und Lysin hydrolysiert werden. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur. Die enzymatische Proteolyse wird durch Zugabe von einem Volumenanteil Puffer A* gestoppt und die Peptide auf StageTips (*stop and go extraction tips*) entsalzt (Rappsilber et al., 2003).

StageTips sind handelsübliche Pipettenspitzen, die C18-Material (Dr. Maisch GmbH) enthalten und somit über hydrophobe Wechselwirkungen Peptide binden. Mit diesen sog. *reverse phase* StageTips werden die Peptide entsalzt, gewaschen und aufkonzentriert. Mit einem kleinen Metallröhrchen werden zwei Lagen EMPORE C18-*Extraction Disk* ausgestanzt und in die Pipettenspitzen gefüllt. Die Equilibrierung erfolgt mit 20 μl 100% Methanol (2.600 rpm, 2 min), 20 μl Puffer B (2.600 rpm, 2 min) und zweimal mit 20 μl Puffer A (2.600 rpm, 2 min). Anschließend werden die Peptide auf die StageTips gegeben und zum Binden durch das C18-Material zentrifugiert (2.600 rpm, ca. 4 min). Zum Waschen

wird erneut 20 μ l Puffer A (2.600 rpm, 2 min) verwendet. Die StageTips werden trocken bei 4°C gelagert, bis die Peptide für die massenspektrometrische Analyse eluiert werden.

Harnstoffpuffer (8M)	Harnstoff	6 M
	Thioharnstoff	2 M
	HEPES	10 mM
	pH-Wert auf 8.0 einstellen	
ABC-Puffer	NH ₄ HCO ₃ in MilliQ-Wasser	50 mM
DTT-Stocklösung (0,5 μ g/ μ l)	DTT ad 10 ml MilliQ-Wasser	5 mg
Iodacetamid-Stocklösung (0,5 μ g/ μ l)	Iodacetamid ad 10 ml ABC-Puffer	5 mg
Puffer A*	Acetonitril	5%
	Trifluoressigsäure	1%
	in MilliQ-Wasser	
Puffer A	Essigsäure	0,5%
	in MilliQ-Wasser	
Puffer B	Acetonitril	80%
	Essigsäure	0,5%
	in MilliQ-Wasser	

2.13.7. Enzymatische Spaltung von Proteinen im Gel

Um die Komplexität der Proben für die massenspektrometrischen Analyse zu reduzieren, kann eine eindimensionale SDS-PAGE durchgeführt werden. Die Proteine werden anschließend im Gel enzymatisch gespalten (*in gel digest*) (Shevchenko et al., 2006).

Nach der SDS-PAGE und Coomassiefärbung werden Probenspuren im Polyacrylamidgel in kleine Stücke aufgeteilt und sauber ausgeschnitten. Jedes Gelstück wird in kleinere

Stückchen (ca. 1 mm³) zerlegt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Alle Protokollschritte werden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Gelstückchen werden zweimal mit 100 µl 50 mM ABC-Puffer/50% Ethanol für 20 min gewaschen und der Überstand jeweils verworfen. Anschließend werden die Stückchen mit 100 µl absolutem Ethanol für 10 min dehydriert, der Überstand wird abgenommen und der restliche Ethanol für 5 min in einer Vakuumzentrifuge verdampft. Nun erfolgt die Reduktion der Proteine mit 100 µl 10 mM DTT in ABC-Puffer bei 56°C für 45 min im Thermomixer. Anschließend wird der Überstand verworfen und die freien SH-Gruppen mittels 100 µl 55 mM Iodacetamid in ABC-Puffer für 30 min in Dunkelheit alkyliert. Nun folgen im Wechsel Wasch- und Dehydrierungsschritte für jeweils 15 min, nach denen jeweils der Überstand verworfen wird. Die Gelstückchen werden erst mit ABC-Puffer gewaschen, anschließend mit absolutem Ethanol dehydriert, erneut mit ABC-Puffer gewaschen und final zweimal mit Ethanol dehydriert. Um die Gelstückchen vollständig zu trocknen, wird der restliche Ethanol für 5 min in der Vakuumzentrifuge verdampft. Nun werden die denaturierten Proteine im Gel enzymatisch mit Lys-C oder Trypsin fragmentiert. 40 µl der jeweiligen Protease mit einer Konzentration von 12,5 ng/µl in ABC-Puffer werden zu den Gelstückchen gegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Die getrockneten Gelstückchen saugen die Enzymlösung auf und quellen. Anschließend wird ABC-Puffer zu den Stückchen gegeben, bis diese mit Flüssigkeit überdeckt sind. Die Proteolyse erfolgt über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag werden die Peptide aus dem Gel mittels aufsteigendem Acetonitrilgehalt eluiert. Dabei werden die Überstände aller Extraktionsschritte in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Im ersten Schritt erfolgt die Extraktion mit 100 µl 30% Acetonitril/3% Trifluoressigsäure (TFA) für 20 min, um die enzymatische Reaktion zu stoppen. Anschließend wird jeweils für 20 min zweimal mit 100 µl 70% Acetonitril in MilliQ-Wasser und zweimal mit 100 µl 100% Acetonitril extrahiert. Die vereinigten Überstände enthalten nun die eluierten Peptide. Deren Volumen wird in der Vakuumzentrifuge auf 80 µl reduziert, mit Puffer A* im Verhältnis 1 : 1 gemischt und auf StageTips gegeben.

2.13.8. *Filter aided sample preparation - FASP*

Die FASP-Methode zur Proteinfragmentierung verbindet die Möglichkeiten, die Komplexität der Proben zu verringern und gleichzeitig die jeweiligen Vorteile der Proteinfragmentierung in Lösung und im Gel zu nutzen (Wisniewski et al., 2009).

Die gelösten und denaturierten Proteine im SDT-Puffer werden auf einen Molekular-

gewichts-Ausschlussfilter (30 kDa) gegeben und in einen Harnstoffpuffer (UA-Puffer) überführt. Dafür werden zweimal je 200 μl UA-Puffer auf den Filter gegeben und die Probe bei 14.000 g für 20 min zentrifugiert. Das SDS wird dabei mit Harnstoff ausgewaschen, um die denaturierenden Bedingungen aufrechtzuerhalten. Kleine Proteine mit einem Molekulargewicht unter 30 kDa können daher die Filtermembran nicht passieren und bleiben auf dem Filter hängen. Anschließend werden die Proteine in 200 μl IAA-Lösung kurz im Thermomixer vermennt und für 20 min in Dunkelheit inkubiert, um freie SH-Gruppen zu alkylieren. Die IAA-Lösung wird durch Zentrifugation bei 14.000 g für 20 min verworfen und die Proteine mit 200 μl UA-Puffer gewaschen. Da die enzymatische Fragmentierung in ABC-Puffer stattfindet, wird der UA-Puffer durch Zentrifugation entfernt und die Proteine mit ABC-Puffer gewaschen. Anschließend findet der Vorverdau in 20 mM ABC mit Lys-C (Enzym zu Protein Verhältnis 1:100) für 3 Stunden bei Raumtemperatur statt. Danach wird erneut Lys-C bzw. Trypsin hinzugefügt (Enzym zu Protein Verhältnis 1:100). Die Proteolyse erfolgt über Nacht bei 37°C auf dem Filter. Die Peptide können nun die Ultrafiltrations-Membran passieren, während Verunreinigungen, wie z.B. Nukleinsäuren oder nicht vollständig verdaute Proteine, zurückbleiben. Die Peptide werden bei 14.000 g für 20 min durch die Membran filtriert. Anschließend wird die Membran mit 200 μl 0,5 M NaCl in MilliQ-Wasser gewaschen und beide Filtrate vereinigt. Die eluierten und aufgereinigten Peptide werden anschließend entsalzt. Kleinere Peptidmengen können direkt auf StageTips geladen und entsalzt werden. Für größere Peptidmischungen werden C18-Extraktions-Filtereinheiten (*Empore disk cartridges-C18*) verwendet. Diese werden wie folgt equilibriert: 1 ml 100% Methanol für 1 min bei 1.500 g zentrifugieren. Diesen Schritt mit 0,5 ml 0,1% TFA/70% Acetonitril in MilliQ-Wasser und mit 0,5 ml 0,1% TFA in MilliQ-Wasser wiederholen. Anschließend wird die Peptidmischung auf den Filter geladen (150 g, 3 min), mit 0,5 ml 0,1% TFA in MilliQ-Wasser gewaschen (150 g, 3 min) und anschließend mit 0,5 ml 70% Acetonitril in MilliQ-Wasser eluiert (150 g, 3 min). Die Peptide können nun fraktioniert werden mittels isoelektrischer Fokussierung oder direkt massenspektrometrisch analysiert werden.

UA-Puffer	Harnstoff	8 M
	Tris/HCl pH 8,5	100 mM
IAA-Lösung	Iodacetamid in UA-Puffer	50 mM

2.13.9. Isoelektrische Fokussierung von Peptiden

Mit dem OFFgel *Fractionator* 3100 wurden in der vorliegenden Arbeit Peptide nach ihren isoelektrischen Punkt (pI) fraktioniert. Dabei kombiniert diese Methode eine isoelektrische Fokussierung in wässriger Phase mit einer standard in-Gel isoelektrischen Fokussierung (IEF) mittels immobilisierten pH-Gradientengelstreifen (IPG-Streifen). Ein 24-*well*-Rahmen wird auf ein IPG-Gel gesetzt, das Gel wird rehydriert und verschließt die einzelnen Kompartimente. Die Peptidprobe wird in einem Ampholyte-haltigen Puffer verdünnt und auf die 24 Kompartimente verteilt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Peptide durch das Gel in das jeweilige Kompartiment, dessen pH-Wert dem isoelektrischen Punkt des Peptides entspricht. Anschließend werden die wässrigen Fraktionen entnommen, welche die entsprechend dem pI aufgetrennten Peptide enthalten. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.14. Massenspektrometrie

Mit der Massenspektrometrie (MS) wird das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) geladener Teilchen bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode zur Messung positiv geladener Peptide verwendet, um basierend auf den detektierten m/z -Verhältnissen die zugehörigen Proteine zu identifizieren und, mit Hilfe der SILAC-Methode, zu quantifizieren. In der Arbeit wird von LC-MS/MS gesprochen, da ein Umkehrphasenchromatographie-System (*liquid chromatography*, LC) über eine Elektrospray Ionenquelle an ein Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) gekoppelt ist.

2.14.1. Umkehrphasenchromatographie

Die Peptide werden von StageTips mittels Puffer B in eine 96-*well*-Platte eluiert und auf ein Volumen von 2 μl in der Vakuumzentrifuge reduziert. Anschließend wird das Probenvolumen auf etwa 10 μl mit Puffer A aufgefüllt. Die Peptide werden mittels eines nano-Flüssigkeitschromatographie-Systems (nanoLC, Agilent 1200 series bzw. Proxeon EASY-nLC) auf eine Umkehrphase- (*reverse phase*, RP) C18-Säule geladen, welche die Peptide nach ihren hydrophoben Eigenschaften auftrennt. Diese Säule besteht aus Quarzglas und wurde bei einem Druck von etwa 80 bar mit 3 μm kleinen C18-Partikel dicht befüllt. C18 bildet eine unpolare stationäre Phase, an der die Peptide in einer wässrigen mobilen Phase binden. Da hydrophobe Komponenten vom C18-Material stärker gebunden werden, eluie-

ren polare Peptide zuerst von der Säule, unpolare später (Umkehrphase). Mit steigendem Gehalt eines organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase werden auch stark hydrophobe Peptide von der Säule gelöst. In der vorliegenden Arbeit wurden die Peptide mit einem linear ansteigenden Gradienten von 5-30% Acetonitril in 0,5% Essigsäure mit einer Flussrate von 200 nl/min über einen Zeitraum von 150 bzw. 240 min aufgetrennt. Das nanoLC-System ist über eine Elektrospray Ionenquelle an einen LTQ-Orbitrap XL oder einen LTQ-Orbitrap Velos Massenspektrometer gekoppelt.

2.14.2. ESI-Tandem-Massenspektrometrie

Die von der C18-Säule eluierten Peptide werden mittels Elektrospray Ionisierung (ESI) protoniert und in die Gasphase übertragen, um anschließend in das Massenspektrometer einzutreten. Die Erfassung der MS-Spektren erfolgt als *full* MS- und MS/MS-scan. Der *full* MS-scan ($m/z = 300-1650$) erfolgt im Orbitrap mit einer Auflösung von 60.000 nach einer Anreicherung von 1.000.000 Ionen. Mit der sog. Top5-Methode werden nun die 5 Ionen mit der höchsten Intensität, die eine mind. zweifache positive Ladung tragen, aus dem *full* MS-Scan in der Ionenfalle (LTQ) isoliert. Nach einer Anreicherung von mindestens 5.000 Ionen erfolgt die Fragmentierung durch Kollision mit Stickstoff als Stoßgas (*collision-induced dissociation*, CID) bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 35%. Anschließend werden die Fragmentionen in den Elektronenmultiplier des LTQs als MS/MS-Scan detektiert. Nach einem MS/MS-Scan beträgt die sog. *exclusion time* 90 Sekunden, um während dieser Zeitspanne die wiederholte Fragmentierung eines bereits analysierten Peptidions auszuschließen. Im LTQ-Orbitrap Velos Massenspektrometer findet eine Isolierung und Fragmentierung von 15 Ionen statt.

2.14.3. Datenverarbeitung mit MaxQuant

Die MS-Rohdaten werden mit der MaxQuant software (Version 1.0.14.1.) ausgewertet (Cox et al., 2009). Im ersten Schritt erfolgt im *Quant*-Modul die Detektion der Isotopenmuster der einzelnen Peptide sowie die Detektion von SILAC-Peptidpaaren. Dafür werden folgende Parameter verwendet: Lys-C als verwendete Endopeptidase mit maximal 2 zulässigen Fehlsplaltungen, Carbamidomethylierung von Cystein als feste Modifikation, Oxidation von Methionin und Acetylierung des N-Terminus von Proteinen als variable Modifikation. Als SILAC-Markierung von Aminosäuren wird Lys-6 angegeben. Anschließend erfolgt die Datenbanksuche der MS/MS-Ionen gegen die IPI-Zebrafischdatenbank (Version 3.54) bzw.

gegen die IPI-Mausdatenbank (Version 3.87) mit Hilfe der Mascot-Suchmaschine (Version 2.2, Matrix Science). Im letzten Schritt werden im *Identify*-Modul die Peptide identifiziert und zu Proteingruppen vereinigt. Hierfür ist eine maximale Massenabweichung von 7 ppm für die Peptidmasse und 0,5 Da für MS/MS-Ionen zulässig. Die Identifizierung von Peptiden erfolgt nur bis zu einer *False Discovery Rate* (FDR) von 1% mit Peptiden von einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren. Des Weiteren werden die Proteine quantifiziert, indem die SILAC-Ratios der einzelnen Peptidpaare zu Protein-Ratios verrechnet werden. Für die Quantifizierung basierend auf SILAC-Paaren müssen mindestens 2 gemessene SILAC-Ratios vorliegen.

2.15. Immunhistochemische Methoden

Die Immunhistochemie (IHC) wird auch Immun- bzw. Antikörperfärbung genannt. Dabei werden Proteine mittels einer immunologischen Reaktion basierend auf Antikörpern farblich nachgewiesen. Bei der indirekten Färbung werden zwei Antikörper eingesetzt: der Primärantikörper bindet spezifisch an das zu detektierende Protein. Der Sekundärantikörper bindet wiederum an den Primärantikörper, wobei mehrere Moleküle des sekundären Antikörpers an den primären binden und die Sensitivität der Färbung erhöhen. Der Sekundärantikörper ist kovalent mit einem Markermolekül verbunden, welches die Detektion über eine Farbreaktion ermöglicht. Dabei kann es sich um ein Enzym oder, wie in der vorliegenden Arbeit, um Fluoreszenzfarbstoffe handeln.

Die Antikörperfärbungen erfolgten an vollständigen Embryonen, daher wird im folgenden Text von *Whole-mount*-Färbung gesprochen.

2.15.1. *Whole-mount*-Antikörperfärbung mit zn-8 gegen ALCAM

Die *Whole-mount*-Färbung mit dem zn-8-Antikörper erfolgte nach dem Protokoll von Dong et al., 2007. Embryonen in einem Alter von 72 hpf werden nach positivem GFP-Signal sortiert und einmal kurz in PT gewaschen. Anschließend erfolgt die Fixierung in 4% PFA in PBS über Nacht bei 4°C. Die fixierten Embryonen werden dreimal kurz mit PBS gewaschen und zum Blockieren in PBT überführt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Inkubation erfolgt eine Stunde bei 4°C. Die Embryonen werden mit dem primären monoklonalen Mausantikörper zn-8 in einer 1:10-Verdünnung in PBT über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wird der Primärantikörper abgenommen, die Embryonen dreimal mit PT gewaschen und mit dem Fluoreszenz-markiertem Alexa-594 Sekundärantikörper

in einer Verdünnung von 1:200 in PBT für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Embryonen dreimal in PT gewaschen und die Färbung mittels Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

2.15.2. Allgemeines Protokoll zur *Whole-mount*-Antikörperfärbung von Zebrafischembryonen

Dieses Protokoll basiert auf Dong et al., 2007 und wurde zusätzlich mit einem Dehydrierungsschritt in Methanol kombiniert, um das Gewebe für die Antikörper zugänglicher zu machen.

Die Embryonen in einem Alter von 72 hpf werden nach positivem GFP-Signal sortiert und in 4% PFA in PBS über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wird die Fixierlösung abgenommen und die Embryonen zweimal kurz in 0,1% Triton X-100 in PBS gewaschen. Die Embryonen werden in 100% eiskalten Methanol überführt und bei -20°C über Nacht dehydriert. Für die Rehydrierung werden die Embryonen sukzessiv in PBS überführt (75% Methanol/25%PBS für 5 min, 50% Methanol/50% PBS für 5 min, 25% Methanol/75%PBS für 5 min, 0,1% Triton X-100 in PBS für 5 min). Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, erfolgt die Blockierung in PBS mit 5% BSA und 0,1% Triton X-100 für eine Stunde bei 37°C. Die Blockierungslösung wird anschließend verworfen. Die Primärantikörper werden in folgenden Verdünnungen in Blockierungslösung verwendet: anti-Paralemmen 1:50, anti-*light meromyosin* (MF20) 1:10, anti-Muskel-Tropomyosin 1:10. Die Inkubation erfolgt bei 4°C über Nacht. Am folgenden Tag werden die Embryonen dreimal jeweils eine Stunde in 0,1% Triton X-100 in PBS bei 4°C gewaschen, um den Überschuss an Antikörper zu entfernen. Die Fluoreszenz-markierten Alexa-594 Sekundärantikörper anti-Maus und anti-Kaninchen werden in Blockierungslösung 1:200 verdünnt und die Embryonen darin über Nacht bei 4°C inkubiert. Erneut wird dreimal jeweils eine Stunde in 0,1% Triton X-100 in PBS bei 4°C gewaschen und die Färbung anschließend mittels Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

3. Ergebnisse

3.1. Die Proteinausstattung der Herzmuskelzellen limitiert die massenspektrometrische Analyse

Da sich das Proteom von Kardiomyozyten deutlich von der Proteinausstattung undifferenzierter Zellen wie embryonalen Stammzellen (ES) unterscheidet, sollen in diesem Kapitel kurz die Merkmale der massenspektrometrischen Analyse von Herzmuskelzellen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen bzw. zu Muskelvorläuferzellen beschrieben werden.

Wie bereits im Kapitel 1.2.4 beschrieben wurde, handelt es sich bei Kardiomyozyten um ausdifferenzierte Muskelzellen des Herzens, welche die Kontraktilität der Ventrikel auf Grund von kontraktilen Sarkomere gewährleisten. Um die Konsequenzen dieses spezialisierten Zelltyps auf die massenspektrometrische Analyse zu untersuchen, wurden embryonale Stammzellen (ES-Zellen), Muskelvorläuferzellen (C₂C₁₂-Myoblasten, MB), isolierte Kardiomyozyten sowie ein gesamtes Mausherz analysiert und verglichen. Die Isolierung der Kardiomyozyten ist in Kapitel 2.11.1 beschrieben. Die Zellen und das Herzgewebe wurden einheitlich in SDT-Puffer homogenisiert. Um die Ergebnisse der verschiedenen Zelltypen vergleichen zu können, wurden nach der Bestimmung der Proteinkonzentration von jeder Probe 15 µg Protein für die enzymatische Spaltung in Lösung (*in solution digest*) eingesetzt. Die Proben wurden sowohl mit dem Enzym Trypsin als auch mit Lys-C in Parallelansätzen verdaut. Anschließend erfolgte die massenspektrometrische Analyse der Proben mit dem LTQ-Orbitrap Velos-Instrument (LC-MS/MS) jeweils mit einem 150 min-Gradienten. Die MS-Rohdaten wurden mit der MaxQuant Software ausgewertet.

Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 8 dargestellt. Für die Auswertung wurden nur Proteine berücksichtigt, die mit mindestens zwei Peptiden identifiziert wurden. Die jeweilige Anzahl identifizierter Proteine ist in Abbildung 8A abgebildet. In den Proben der undifferenzierten ES-Zellen konnten 2566 (Trypsin-Verdau) bzw. 2476 (Lys-C-Verdau) Proteine detektiert werden. Die Proben der Myoblasten ergaben 2227 bzw. 2136 Proteine. Ausgehend von dem Lys-C-Verdau der ES-Zellen, sinkt der Anteil detektierbarer Proteine

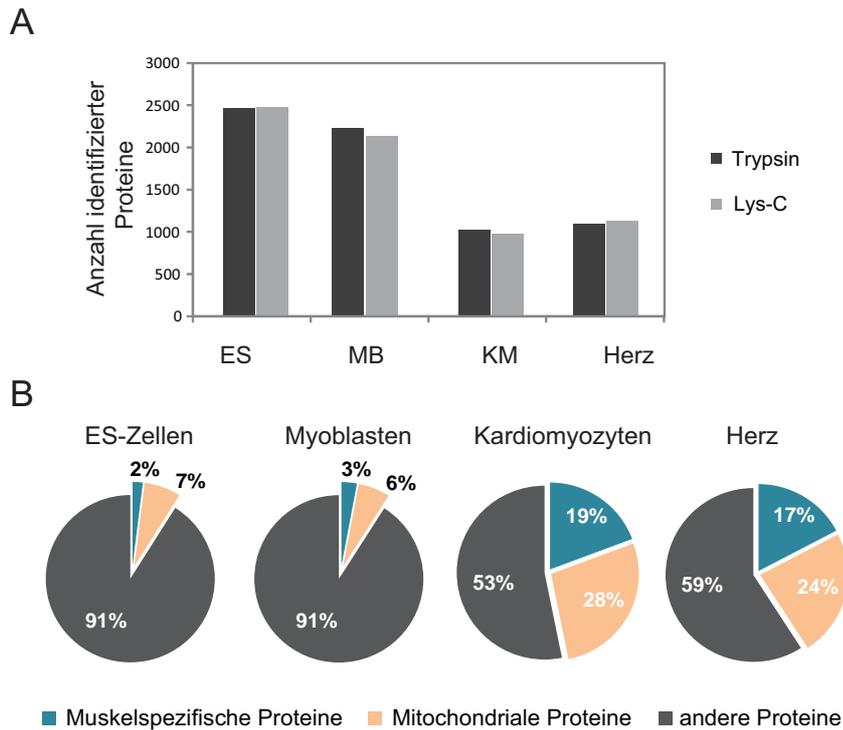


Abbildung 8.: Die Ergebnisse der vergleichenden Analyse zwischen undifferenzierten, embryonaler Stammzellen (ES), Muskelvorläuferzellen (C_2C_{12} -Myoblasten, MB), isolierten Kardiomyozyten (KM) sowie ein gesamtes Mausherzen. (A) Die Anzahl identifizierter Proteine der einzelnen Proben nach Trypsin- bzw. LysC-Verdau. (B) Die Verteilung muskelspezifischer (blau) und mitochondrialer (orange) Proteine in den Proben des Lys-C-Verdau. Der Anteil der jeweiligen Proteingruppe basiert auf der Anzahl detektierter Peptide.

in den Myoblasten auf 86,3%. In der Probe der Kardiomyozyten verringert sich dieser Anteil auf 39,1%, da nur noch 1018 (Trypsin-Verdau) bzw. 969 (Lys-C-Verdau) Proteine detektiert werden konnte. Die Analyse der Herzprobe ergab 1097 bzw. 1129 Proteine, was einem Anteil von 45,6% detektierter Proteine im Vergleich zu den ES-Zellen entspricht.

Die Verwendung von Lys-C als Enzym zeigte im Vergleich zu Trypsin kaum Unterschiede, da die jeweilige Anzahl identifizierter Proteine vergleichbar ist. Im Gegensatz zu Trypsin, welches Peptidbindungen nach Arginin und Lysin spaltet, erfolgt die enzymatische Proteinspaltung mit Lys-C ausschließlich nach der Aminosäure Lysin. In vergleichenden Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass die Verwendung von Lys-C in globalen Proteinanalysen zu einer geringeren Proteinidentifikation von etwa 10 - 15% führt (Wisniewski

et al., 2009; Swaney et al., 2010). Da Lys-C die Proteine spezifisch nur nach Lysin spaltet, entstehen Peptide mit einer theoretischen Länge von durchschnittlich 13 Aminosäuren (Swaney et al., 2010). Im Gegensatz dazu erfolgt die Proteinspaltung mit Trypsin nach zwei Aminosäuren (Arginin und Lysin), wodurch kleinere Peptide mit einer durchschnittlichen Länge von 8 Aminosäuren entstehen. Die Analyse von kleinen Peptiden führt anschließend zu einer besseren Identifikationsrate (Swaney et al., 2010). Da die experimentellen Peptidlängen aus der vorliegenden Studie von durchschnittlich 13 (Trypsin) und 14 (Lys-C) Aminosäuren vergleichbar sind, wurden kaum Unterschiede in der Identifikation von Proteinen dokumentiert. In den folgenden Kapiteln dieser Arbeit wurde das Enzym Lys-C als Standardenzym zur Fragmentierung von Proteinen eingesetzt, da Lysin-6-markiertes Gewebe verwendet wurde.

Der stark verringerte Anteil an detektierbaren Proteinen in den Herzproben bzw. in den Proben isolierter Kardiomyozyten bei gleicher Probenmenge (jeweils 15 μg) resultiert aus der hohen Komplexität differenzierter Herzmuskelzellen und dem damit einhergehenden, großen dynamischen Bereich zwischen schwach und stark exprimierten Proteinen. Auf Grund der dominierenden Ausstattung der Zellen mit z.T. großen Strukturproteinen innerhalb der Sarkomere sowie einem hohen Anteil an Mitochondrien entfällt ein deutlicher Messanteil auf die Detektion dieser hoch abundanten Proteine. Dies hat zur Folge, dass sich die Anzahl detektierbarer Proteine deutlich reduziert. Ein Vergleich der zellulären Ausstattung zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen ist in Abbildung 8B dargestellt. Die detektierten Proteine der einzelnen Proben (jeweils der Lys-C-Verdau) wurden anhand von ausgewählten GO (*Gene Ontology*)-Termen gruppiert. Die GO-Datenbank ermöglicht die Zuordnung einheitlicher Terme zu Genen bzw. Genprodukten, um deren zelluläre Lokalisation (*cellular component*, GOCC), molekulare Funktion (*molecular function*, GOMF) und Beteiligung an biologischen Prozessen (*biological process*, GOBP) unabhängig vom Organismus zu beschreiben (Ashburner et al., 2000). Muskel-spezifische Proteine wurden nach den GO-Termen *muscle*, *sarcomere* und *cardiac* gruppiert, um sie eindeutig von Strukturproteinen des Cytoskeletts zu unterscheiden. Um den Anteil der Proteingruppe an der Gesamtheit der detektierten Proteine zu ermitteln und zu vergleichen, wurden alle Peptide, die auf diese Gruppe entfallen, summiert und prozentual ins Verhältnis zur Gesamtzahl detektierter Peptide gestellt. Auf diese Weise wird der Anteil einer Proteingruppe nicht nur durch die Anzahl der verschiedenen Proteine, sondern auch durch deren Größe und Häufigkeit bestimmt. Von großen und hoch abundanten Proteine wie Titin oder Myosinen werden häufig mehr als 100 Peptide detektiert. Gering expimierte Proteine werden oft nur

mit 2 oder 3 Peptiden identifiziert. Eine entsprechende Gruppierung erfolgte auch mit dem GO-Term *Mitochondrion*, um den Anteil mitochondrialer Proteine zu ermitteln.

In der Probe der ES-Zellen wurden 15085 Peptide detektiert, die zur Identifizierung von 2476 Proteinen führten. Von diesen 15085 Peptiden wurden 293 Peptide ($\cong 2\%$) der Gruppe muskelspezifischer Proteine und 1052 Peptide ($\cong 7\%$) der Gruppe mitochondrialer Proteine zugeordnet. In den Kardiomyozyten und der Herzprobe konnte eine starke Zunahme am Anteil beider Proteingruppen dokumentiert werden. In der Probe der isolierten Kardiomyozyten wurden 6451 Peptide detektiert, von denen 1412 ($\cong 19\%$) der Gruppe muskelspezifischer Proteine und 1775 Peptide ($\cong 28\%$) zu mitochondrialen Proteinen zugeordnet wurden. Somit entfällt etwa jedes zweite detektierte Peptid auf muskelspezifische oder mitochondriale Proteine. Für die Herzprobe konnte eine ähnliche Verteilung beschrieben werden, wobei die Anteile beider Gruppen etwas geringer ausfallen (Muskel-spezifische Proteine: 17%, mitochondriale Proteine: 24%). Neben den Kardiomyozyten enthält Herzgewebe auch andere Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelzellen und neuronale Zellen, wodurch der Anteil von Proteinen der Muskulatur und der Mitochondrien sich etwas verringert. Parallel dazu steigt die Anzahl identifizierter Proteine im Vergleich zur Probe der isolierten Kardiomyozyten leicht an (Abbildung 8A, Kardiomyozyten: 969 Proteine, Herz: 1129 Proteine).

Um die Proteinzusammensetzung der verschiedenen Zelltypen noch deutlicher zu charakterisieren, wurde die absolute Menge der einzelnen Proteine bestimmt, um deren Anteil am detektierten Proteom zu beschreiben. Die Berechnung der Proteinmengen erfolgte durch MaxQuant basierend auf den massenspektrometrischen Daten. Hierfür wurden die Peakintensitäten aller Peptide eines Proteins summiert und anschließend durch die Anzahl aller theoretisch detektierbaren Peptide dieses Proteins dividiert. Der daraus resultierende iBAQ-Wert (*intensity based absolute quantification*, iBAQ) beschreibt die Menge des Proteins in der Probe (Schwanhauser et al., 2011). An Hand des detektierten Gesamtproteoms, welches durch die Summe der iBAQ-Werte aller detektierten Proteine einer Probe bestimmt wurde, konnte der prozentuale Mengenanteil jedes Proteins berechnet werden. In der Abbildung 9 wurden die Mengenanteile als prozentuale Summenhäufigkeiten dargestellt. Hierfür wurden die einzelnen Proteinmengen beginnend mit den niedrig abundanten Proteinen summiert (kumuliert) und gegen die prozentuale Anzahl der Proteine aufgetragen. In allen vier Proben ist ein langsamer Anstieg der kumulativen Proteinmenge auf Grund der großen Anzahl niedrig abundanter Proteine zu erkennen. Im Vergleich zu der Probe der isolierten Kardiomyozyten und des Herzens steigen die Kurven der ES-Zellen und der Myoblasten

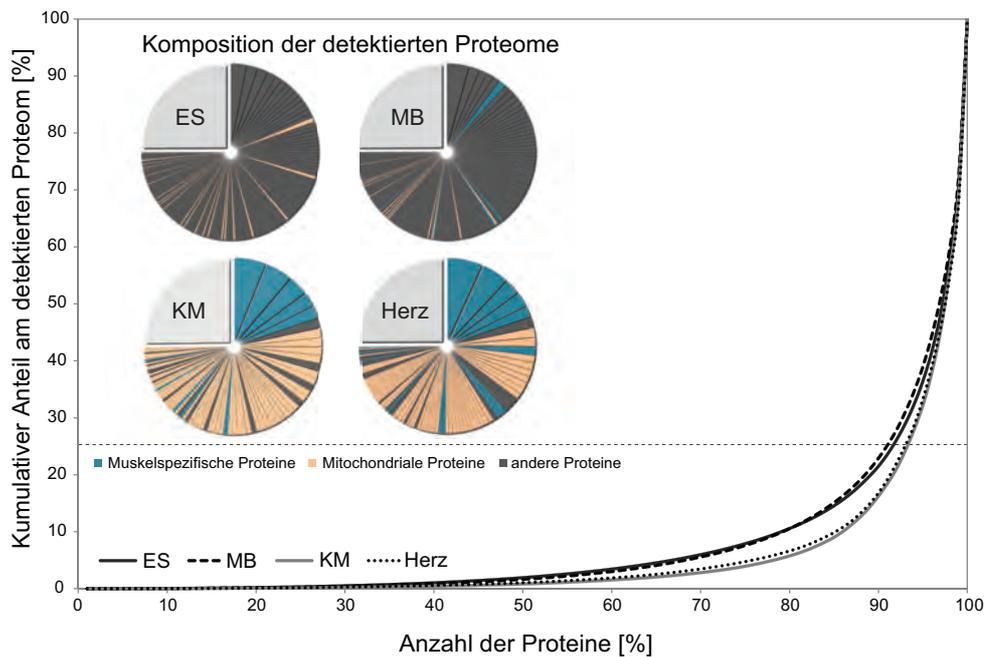


Abbildung 9.: Absolute Quantifizierung der Proteinmengen. Im Diagramm wurden die kumulierten Proteinmengen (%) beginnend mit den niedrig abundanten Proteinen gegen die Anzahl der identifizierten Proteine (%) der vier Proben aufgetragen. Die höher abundanten Proteine, die einen Anteil von 75% am Proteom stellen, wurden als Kreisdiagramme dargestellt. Jeder Teil des Kreises entspricht dem prozentualen Anteil eines Proteins am Proteom. Muskelspezifische (blau) und mitochondriale (orange) Proteine wurden farblich gekennzeichnet. (ES, embryonale Stammzellen; MB, Myoblasten; KM, Kardiomyozyten)

etwas schneller, aber kontinuierlich und gleichmäßig an. Die grau gestrichelte, horizontale Linie in der Abbildung 9 markiert den kumulativen Anteil von 25% an der Gesamtmenge der detektierten Proteine. Die Kurven der ES-Zellen und der Myoblasten erreichen diesen Anteil bei etwa 91% der identifizierten Proteine, die Kurven der Kardiomyozyten und des Herzens bei etwa 93%. D.h., nur 25% des detektierten Proteoms wird durch 91% bzw. 93% der identifizierten Proteine abgedeckt. Um nun die höher abundanten Proteine zwischen den Proben zu vergleichen, wurden die 7% bzw. 9% der Proteine, die einen Anteil von 75% an der Proteinmenge stellen, als Kreisdiagramm in Abbildung 9 dargestellt. Jeder Teil des Kreises entspricht dem prozentualen Anteil eines Proteins am Proteom. Zusätzlich wurden muskelspezifische (blau) und mitochondriale (orange) Proteine, entsprechend der oben beschriebenen GO-Analyse, farblich dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass die Anteile der einzelnen Proteine am Proteom in den Proben der ES-Zellen und der Myo-

blasten kleiner sind im Vergleich zu den Proben der differenzierten Herzmuskelzellen. In der Probe der ES-Zellen und Myoblasten stellen die 23 bzw. 24 Proteine mit der höchsten Abundanz einen Anteil von 25% am detektierten Proteom. Im Vergleich dazu decken nur 8 hoch abundante Strukturproteine 25% des Proteoms in den Kardiomyozyten und Herzen ab. Bei diesen Proteinen handelt es sich u.a. um das *Ventricular myosin regulatory light chain*, *Myoglobin*, *Myosin light chain 3*, *Myosin heavy chain 6* und *alpha cardiac actin*. Des Weiteren konnte ein hoher Anteil mitochondrialer Proteine in diesen Proben dokumentiert werden. Beide Proteingruppen stellen einen Anteil von 67,2% (Kardiomyozyten) bzw. 61% (Herzen) am gesamten Proteom. In den ES-Zellen und Myoblasten liegt dieser Anteil nur bei 5,6% bzw. 4,6%.

Die Analyse zeigt eindeutig, dass die Anzahl detektierbarer Proteine von der Redundanz des Proteoms abhängig ist. Muskelzellen zeichnen sich durch einen hohen Anteil redundanter Proteine aus, wodurch die Anzahl identifizierter Proteine abnimmt. 67,2% des detektierten Proteoms der Herzmuskelzellen resultieren aus hoch abundanten und großen Strukturproteinen sowie mitochondrialen Proteinen, wodurch nur eine partielle Erfassung des Kardiomyozyten-Proteoms möglich ist. In Anbetracht dieser Limitierung werden in den nachfolgenden Kapiteln Methoden zur Auftrennung des Proteoms wie die SDS-PAGE, die subzelluläre Fraktionierung und die isoelektrische Fokussierung von Peptiden angewendet, um die Komplexität der Kardiomyozyten zu verringern und die Anzahl detektierbarer Proteine zu erhöhen.

3.2. Markierung von *Danio rerio* mit $^{13}\text{C}_6$ -Lysin

3.2.1. Markierung von Modellorganismen für die Herstellung des SILAC-Fischfutters

Für die Markierung von *D. rerio* wurde das Isotopen-markierte $^{13}\text{C}_6$ -Lysin (Lysin-6) verwendet, da es sich bei Lysin um eine essentielle Aminosäure handelt und eine Konvertierung in andere Aminosäuren bisher nicht beschrieben wurde. Für SILAC-Anwendungen mit kultivierten Zellen werden häufig Kombinationen der Aminosäuren Lysin und Arginin verwendet, um die enzymatische Proteinspaltung mit dem Enzym Trypsin durchzuführen. Trypsin spaltet Peptidbindungen nach Arginin und Lysin, wodurch Peptide entstehen, die C-terminal mit mindestens einer schweren Aminosäure markiert sind. Somit können alle tryptischen Peptide, außer die C-terminalen, für die Quantifizierung verwendet werden. Da in Organismen wie *S. cerevisiae* (Bicho et al., 2010) und *D. melanogaster* (Sury et al., 2010) die Konvertierung von Arginin in andere Aminosäuren wie Prolin beschrieben wurde, erfolgte die Markierung von *D. rerio* ausschließlich mit Lysin-6 und für alle enzymatischen Spaltungen wurde das Enzym Lys-C verwendet, welches Peptidbindungen spezifisch nach Lysin spaltet. Dadurch kann jedes Peptid quantifiziert werden, da es ein C-terminales, schweres Lysin trägt.

Für eine vollständige Markierung des Zebrafischs mit Lysin-6 ist eine Ernährung notwendig, die anstelle des normalen Lysins ausschließlich das Isotopen-markierte, schwere Lysin-6 enthält. Daher wurden für die Herstellung des SILAC-Fischfutters verschiedene Modellorganismen mit Lysin-6 markiert (Kapitel 2.9). Für die vollständige Markierung von *E. coli* wurden die Zellen in supplementiertem, lysinfreiem M9-Medium zuzüglich 50 mg/l Lysin-6 zweimal bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert. Die Markierung von *S. cerevisiae* erfolgte in lysinfreiem YNB-Medium zuzüglich 30 mg/l Lysin-6. Die Zellen wurden dreimal bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert. Um die Fruchtfliege *D. melanogaster* mit Lysin-6 zu markieren, wurde das Protokoll von Sury et al. (2010) leicht modifiziert. Für die Kultivierung der Fliegen wurden 200 mg lyophilisierte Hefezellen in 10 ml Saccharoselösung gelöst, um damit mehrere Lagen von dünnem Tissue-Papier zu tränken, die in einem Kultivierungsröhrchen ausgelegt wurden. Adulte Fliegen wurden auf die getränkte Unterlage gesetzt und für 2 Wochen bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer kultiviert. Anschließend wurden die Larven abgesammelt und für die Herstellung des Fischfutters verwendet.

Um die Markierungsraten der Modellorganismen zu kontrollieren, wurden Zellpellets von

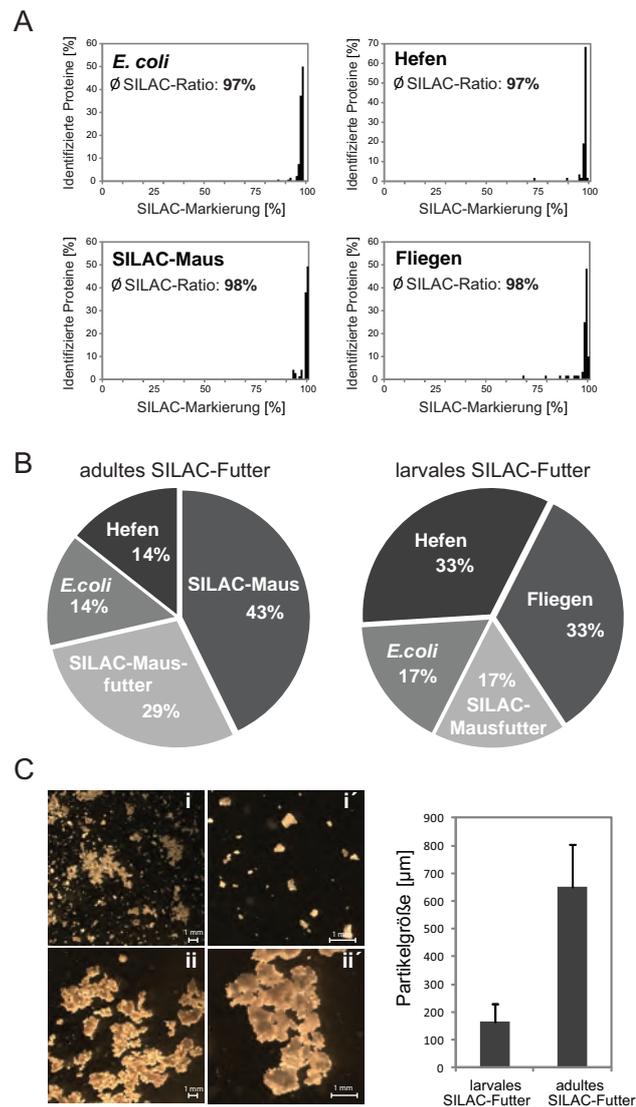


Abbildung 10.: Zusammensetzung des SILAC-Fischfutters. (A) Die Ernährung und Markierung der Zebrafische erfolgte mit Futter basierend auf vollständig Lysin-6-markierte Zellen von *E. coli* (97%), *S. cerevisiae* (97%), der SILAC-Maus (99%) und *D. melanogaster* (98%). (B) Die Zusammensetzung des SILAC-Futters entspricht den Bedürfnissen von adulten (links) und larvalen (rechts) Zebrafischen. (C) Die Futterpartikel des larvalen SILAC-Futters sind mit einer zehnfachen (i) und dreißigfachen (i') Vergrößerung dargestellt. Das SILAC-Futter für adulte Fische (ii und ii') beinhaltet anstelle der Fliegenlarven Gewebe der SILAC-Maus und besitzt daher eine größere Partikelgröße von durchschnittlich 650 µm.

E. coli und *S. cerevisiae* sowie drei Larven von *D. melanogaster* in Harnstoffpuffer (8M) homogenisiert (Kapitel 2.13.6). Die enzymatische Spaltung der Proteine erfolgte *in solution*

mit dem Enzym Lys-C, gefolgt von der massenspektrometrischen Analyse (LC-MS/MS). Durch den metabolischen Einbau der schweren Aminosäure Lysin-6 werden Peptide als SILAC-Paare detektiert. Neben der leichten, Lysin-0-haltigen Version des Peptids wird in einem Abstand von 6 Da zusätzlich die schwere, Lysin-6-haltige Version detektiert. Basierend auf den Peak-Intensitäten beider Peptidversionen erfolgte die Bestimmung der SILAC-Ratios, welche das Verhältnis der Intensität des schweren (*heavy*) Peptids zur Intensität des leichten (*light*) Peptids ausdrückt ($^{heavy}/^{light}$ - Ratio oder H/L - Ratio). Besitzen beide Peptidversionen die gleiche Intensität, beträgt die H/L - Ratio 1:1. Über die SILAC-Ratio kann die Einbaurrate des Lysin-6 bestimmt werden, indem die prozentuale SILAC-Markierungsrate berechnet wird. Bei einer SILAC-Ratio von 1:1 beträgt die Markierungsrate 50%.

$$\text{SILAC-Markierungsrate [\%]} = (\text{SILAC-Ratio} \times 100) \div (\text{SILAC-Ratio} + 1)$$

Ausgehend von allen detektierten SILAC-Ratios in den Proben der Modellorganismen wurden prozentuale SILAC-Markierungsraten berechnet. Die Markierungsraten wurden anschließend als Häufigkeitsverteilung in Abbildung 10A dargestellt. Die Verteilung gibt an, wie häufig eine Markierungsrate innerhalb der Daten vorkommt. Die Balkendiagramme enthalten daher die in *Bins* gruppierten Markierungsraten (X-Achse) im Bezug auf ihre relative Häufigkeit (in %) (Y-Achse). Anschließend wurden die einzelnen Markierungsraten der Proteine gemittelt, um die durchschnittliche Gesamtmarkierung der Organismen zu erhalten. Bei *E. coli* beträgt die Einbaurrate von Lysin-6 97%, bei *S. cerevisiae* 97%, bei der SILAC-Maus 99% und bei *D. melanogaster* 98%. In allen Organismen konnte somit einer vollständigen Markierung erreicht werden. Auf Grund der Reinheit der schweren Aminosäuren von etwa 98% bis 99% (Silantes GmbH) kann in den markierten Organismen eine Einbaurrate von über 99% nicht erzielt werden. Des Weiteren verbleiben Proteine mit einer sehr langsamen Umsatzrate über einen langen Zeitraum im Gewebe, ohne neu synthetisiert zu werden. Diese Proteine enthalten daher auch nach längerer Markierungszeit leichte Aminosäuren, wodurch die durchschnittliche Einbaurrate 97% betragen kann.

Ausgehend von den vollständig Lysin-6-markierten Organismen wurde ein SILAC-Fischfutter für larvale und adulte Zebrafische entwickelt (Kapitel 2.10.2). Die Anteile der jeweiligen Modellorganismen am Futter ist in Abbildung 10B dargestellt. Die adulten Fische können auf Grund ihrer Größe Futter mit einer Partikelgröße von etwa einem Millimeter aufnehmen, wodurch der entsprechend große Anteil an SILAC-Mausgewebe (43%) im adulten SILAC-Futter möglich ist (Abbildung 10C). Gewebe der SILAC-Maus wie Muskel-

und Fettgewebe wurden entnommen, fein zerhackt und lyophilisiert. Weitere Bestandteile sind das SILAC-Mausfutter (29%) (Silantes) und schwere Hefe- und *E. coli*-Zellen (jeweils 14%). Die Zellen wurden lyophilisiert und mit dem getrocknetem Mausgewebe in dem angegebenen Verhältnis gemischt und homogen gemörsert. Die Fütterung der Fische erfolgte zweimal täglich. Im Gegensatz dazu benötigen Zebrafische im Larvenstadium ein Futter mit kleiner Partikelgröße (< 1 mm). Die nährstoffreichen Fliegenlarven, die keine kompakte Gewebestruktur aufweisen, eignen sich daher sehr gut als Basis (33,3%) für larvales SILAC-Fischfutter. Die Fliegenlarven wurden in Flüssigstickstoff gefroren und in einem Mörser zu feinem Pulver gemahlen. Anschließend wurden lyophilisierte Hefe- (33,3%) und *E. coli*- (16,6%) Zellen sowie SILAC-Mausfutter (16,6%) hinzugefügt. Die Mischung wurde homogen gemörsert und erneut gefriergetrocknet, um die restliche Feuchtigkeit zu entfernen und ein feines Pulver zu erhalten (Abbildung 10C).

3.2.2. Die partielle SILAC-Markierung reflektiert die Beschaffenheit verschiedener Gewebetypen

Über einen Zeitraum von fünf Wochen wurden adulte Zebrafische zweimal täglich mit dem schweren Fischfutter ernährt. Um den Einfluss der Nahrung auf den Zustand der Fische zu kontrollieren, wurden das Gewicht der einzelnen Fische einmal pro Woche dokumentiert. Als Kontrolle dienten konventionell gefütterte Zebrafische. In der Abbildung 11 wurde das durchschnittliche Gewicht der Kontroll- und SILAC-Fische zu den einzelnen Zeitpunkten aufgetragen. Im Verlauf der fünf Wochen blieb das durchschnittliche Körpergewicht beider Gruppen konstant. Da sich sowohl das Körpergewicht als auch die Aktivität zur Fortbewegung nicht veränderten, eignet sich die Zusammensetzung des schweren Futters zur Ernährung der Fische. Um die Inkorporation von Lysin-6 und damit die regelmäßige Aufnahme des Futters während der fünf Wochen zu dokumentieren, wurde jede Woche ein Fisch entnommen und die Inkorporationsrate analysiert. Verschiedene Organe wie das Herz, Gehirn, die Kiemen, Leber, Augen und das Blut wurden präparieren und in SDT-Puffer homogenisiert. Anschließend wurden die Proben enzymatisch mit Lys-C in Lösung verdaut und massenspektrometrisch analysiert (LC-MS/MS). In den einzelnen Proben wurden jeweils über einhundert Proteine mit SILAC-Ratio detektiert (Herz: 371 Proteine; Leber: 724 Proteine). Um die Inkorporation von Lysin-6 in den verschiedenen Organen zu bestimmen, wurden Markierungsraten ausgehend von den gemessenen SILAC-Ratios wie im vorherigen Kapitel berechnet (Kapitel 3.2.1).

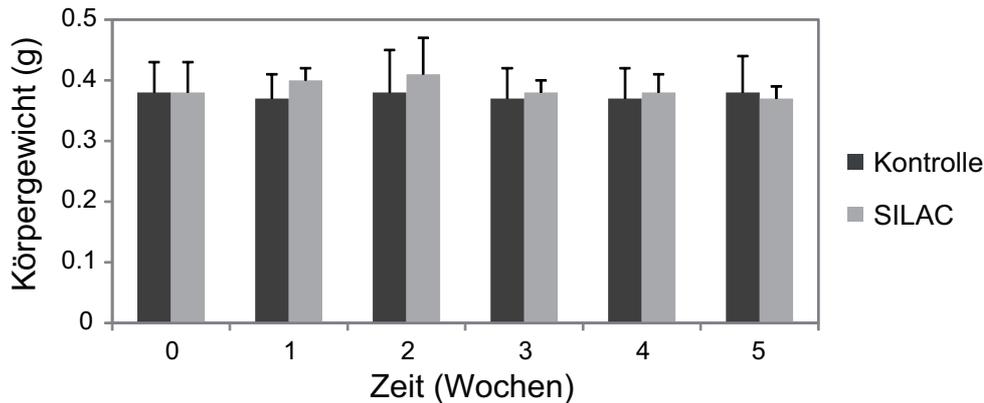


Abbildung 11.: Gewichtskurve von konventionell gefütterten (Kontrolle, $n = 7$) Zebrafischen und von Tieren, welche mit dem SILAC-Futter ernährt wurden (SILAC, $n = 7$). Das durchschnittliche Gewicht wurden mit den Standardabweichungen gegen die Zeit ausgetragen.

In der Abbildung 12 sind die Markierungsraten der verschiedenen Organe nach einer, drei und fünf Wochen als Häufigkeitsverteilung in Balkendiagrammen dargestellt. Die in *Bins* gruppierten Markierungsraten (X-Achse) wurde gegen ihre relative Häufigkeit (in %) (Y-Achse) aufgetragen. Die Verteilung gibt an, wie häufig eine Markierungsrate innerhalb der Daten vorkommt. Um die durchschnittliche Gesamtmarkierung der Organe zu berechnen, wurden die einzelnen Markierungsraten gemittelt. In den Organen Herz, Gehirn und Auge konnten vergleichbare Markierungsraten detektiert werden. Die Einbaurrate stieg während der fünf Wochen im Herzen von 4% (Woche (W) 1) über 10% (W3) auf 18% (W5) an. Im Gehirn wurden Markierungsraten von 4% (W1), 10% (W3) und 21% (W5) und in den Augen von 6% (W1), 11% (W3) und 24% (W5) bestimmt. Eine etwas höhere Einbaurrate konnte in den Kiemen detektiert werden. In diesem Gewebe stieg die Inkorporation nach fünf Wochen auf 39%. Die stärkste Inkorporation von Lysin-6 erfolgte in der Leber, in welcher Markierungsrate von 10% (W1), 25% (W3) und 54% (W5) bestimmt wurden. Anhand der Häufigkeitsverteilungen der beschriebenen Organe in Abbildung 12 ist eine gleichmäßige Zunahme der Inkorporation von Lysin-6 bei allen detektierten Proteinen während der Markierungsperiode zu erkennen. Lediglich im Blut konnte eine hohe Markierungsvarianz der Proteine detektiert werden. In der Häufigkeitsverteilung der Markierungsraten nach drei und fünf Wochen sind zwei Proteingruppierungen mit deutlich unterschiedlichen Inkorporationsraten zu erkennen.

Um die Inkorporation von Lysin-6 anhand von MS-Spektren zu verdeutlichen, wurden

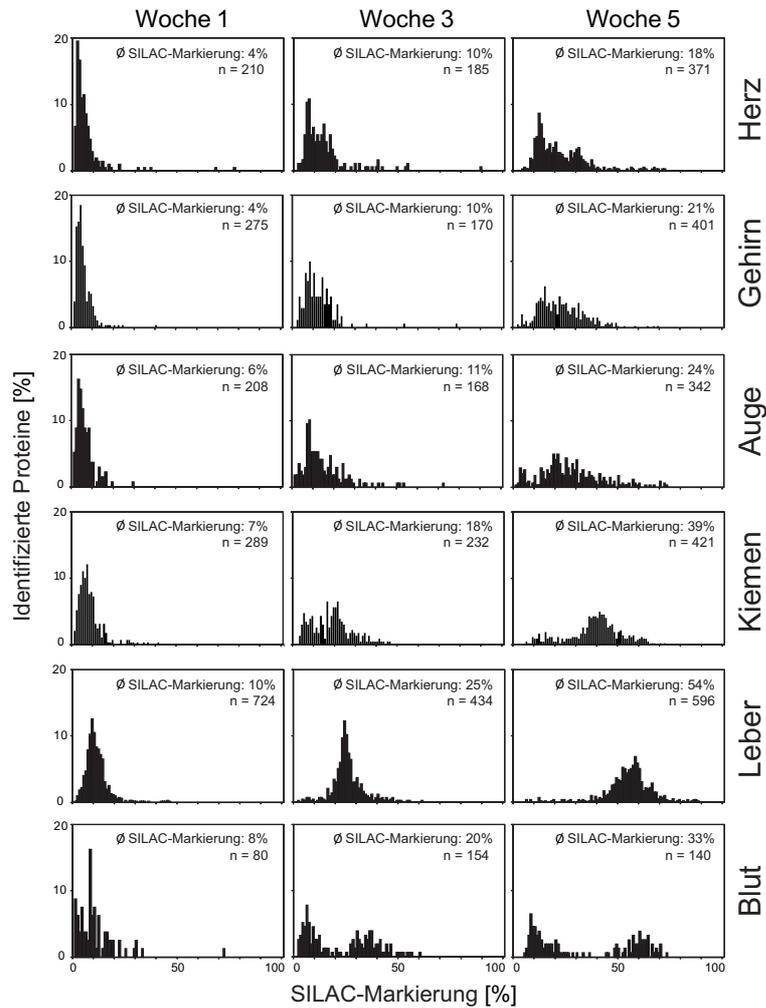


Abbildung 12.: Markierung von *D. rerio* mit Lysin-6. Balkendiagramme zeigen die Markierungsraten der Organe Herz, Gehirn, Auge, Kiemen, Leber und Blut nach einer, drei und fünf Wochen SILAC-Fütterung. Die in Bins gruppierten Markierungsraten (X-Achse) wurden gegen ihre relative Häufigkeit (Y-Achse) aufgetragen. Mittlere Markierungsraten (\emptyset SILAC-Markierung) und die Anzahl (n) der detektierten Proteine mit SILAC-Ratio sind für jedes Experiment angegeben.

exemplarische Spektren von Peptiden des *Beta B3-Crystallins* aus dem Auge und des *Apolipoproteins A-1* aus der Leber in Abbildung 13A und B dargestellt. Das Lysin-0-haltige Isotopenmuster des leichten Peptids wurde mit einem weißen Kreis markiert, das Lysin-6-haltige Isotopenmuster des schweren Peptids mit einem schwarzen Kreis. Der Abstand zwischen den Peaks beträgt 6 Da. Als Beispiel für ein Protein mit niedriger Inkorporati-

onsrate sind die MS-Spektren eines Peptids von *Beta B3-Crystallin* des Auges dargestellt (Abbildung 13A). Die Inkorporation von Lysin-6 nach der ersten Markierungswoche war minimal. Dementsprechend wurde der schwere Peak mit einer sehr geringen Intensität detektiert und die Markierungsrate anhand der SILAC-Ratio (H/L - Ratio) von 0,01 mit 1,2% berechnet. Nach drei Wochen Fütterung mit dem schweren Fischfutter stieg die Inkorporation nur minimal auf 1,3%. Nach der fünften Woche wurde eine SILAC-Ratio von 0,03 detektiert, was einer Markierungsrate von 3,1% entspricht. Im Gegensatz dazu besitzt das *Apolipoprotein A-1* der Leber eine hohe Inkorporationsrate. Nach der ersten Markierungswoche konnte ein deutlicher Anstieg der Intensität des schweren Peaks verzeichnet werden (Abbildung 13B). Basierend auf der SILAC-Ratio von 0,17 stieg die Inkorporation von Lysin-6 auf 14,5%. Mit dem weiteren Verlauf der Markierung wurde eine zunehmende Intensität des schweren Peaks detektiert. Nach drei Wochen stieg die Markierungsrate auf 43,5% (SILAC-Ratio: 0,77) und nach fünf Wochen auf 70% (SILAC-Ratio: 2,33).

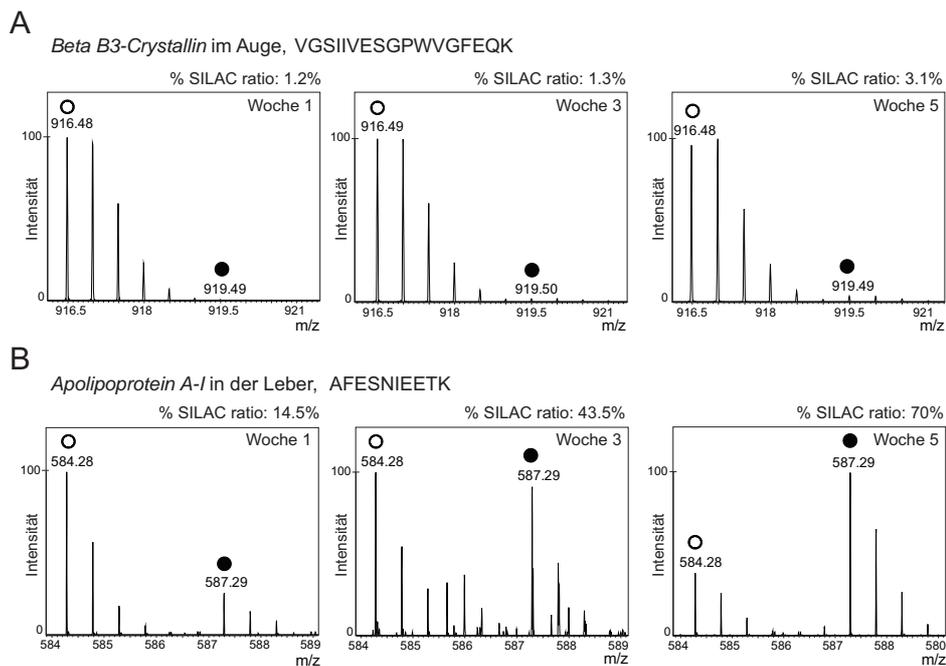


Abbildung 13.: Beispielspektren von Proteinen mit hohem und niedrigem Turnover. (A) MS-Spektren eines Peptidpaares von *Beta B3-Crystallins* des Auges. Nach 5 Wochen Markierung beträgt die Lysin-6-Inkorporation 3,1%. (B) Die MS-Spektren vom *Apolipoprotein A-1* aus der Leber zeigen eine Lysin-6-Inkorporation von 70% nach 5 Wochen.

Für eine detaillierte Betrachtung der Proteinumsatzraten in verschiedene Gewebetypen wurde der Verlauf der Markierungsraten einzelner Proteine dargestellt. In Abbildung 14 wurden die Markierungsraten verschiedener Proteine des Auges und des Blutes gegen die Zeit aufgetragen. Neben den Kristallinen mit einer niedrigen Inkorporationsrate konnten im Auge auch Proteine mit einer hohen Inkorporation von Lysin-6 detektiert werden. Proteine der Netzhaut, wie zum Beispiel die *Phosphodiesterase 6C*, das *Opsin-1* und *Rod transducin α* sind bis zu 60% mit Lysin-6 markiert (Abbildung 14A). Der Verlauf der Markierungsraten im Blut zeigt erneut die deutliche Gruppierung von Proteinen mit hohen und niedrigen Inkorporationsraten (Abbildung 14B). Sekretierte Proteine des Blutplasmas zeigen eine hohe Lysin-6-Inkorporation bis zu 70%, wie zum Beispiel das *Apolipoprotein A-1*, *Complement component 3* oder *Fibrinogen beta*. Dahingegen sind Proteine, die von den Erythrozyten stammen, nur schwach mit Lysin-6 markiert. Für *Hemoglobin beta-1*, *Erythroid band 3 anion exchanger 1* und *Spectrin* konnte eine Inkorporationsrate von unter 10% ermittelt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inkorporation von Lysin-6 nicht nur von den Halbwertszeiten der Proteine, bedingt durch Neusynthese und Degradation, sondern auch von der Struktur und den Eigenschaften des Gewebes abhängig ist. Kiemen, Gehirn, Leber und Herz zeichnen sich durch eine unterschiedliche Stoffwechselaktivität und Zellproliferation aus, die durch gewebespezifische Markierungsraten der Proteine reflektiert werden. Für das Protein *Eukaryotic translation elongation factor 2*, welches an der Proteinbiosynthese beteiligt ist und daher ubiquitär exprimiert wird, wurden verschiedene Markierungsraten detektiert. Nach fünf Wochen wurde für dieses Protein eine Lysin-6-Inkorporation von 20,2% (Auge), 36,6% (Herz), 43,6% (Gehirn), 56% (Kiemen) und 74,6% (Leber) detektiert. Die Inkorporationsraten spiegeln die durchschnittlichen Markierungsraten der Organe wider (Abbildung 12). Auf diesem Wege lässt die partielle SILAC-Markierung des Zebrafisches Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der verschiedenen Gewebetypen zu und ermöglicht eine vergleichende Analyse von Gewebeaktivitäten.

3.2.3. Charakterisierung regenerativer Prozesse in der Schwanzflosse von *D. rerio*

Der Modellorganismus *D. rerio* besitzt die Fähigkeit der Regeneration in verschiedenen Organen wie der Flossen, dem Herzen oder der Photorezeptoren der Netzhaut (Tal et al., 2010). Mit Hilfe der partiellen SILAC-Markierung sollten regenerative Prozesse auf Proteinebene untersucht werden, wobei in der vorliegenden Studie der Fokus auf die Regeneration

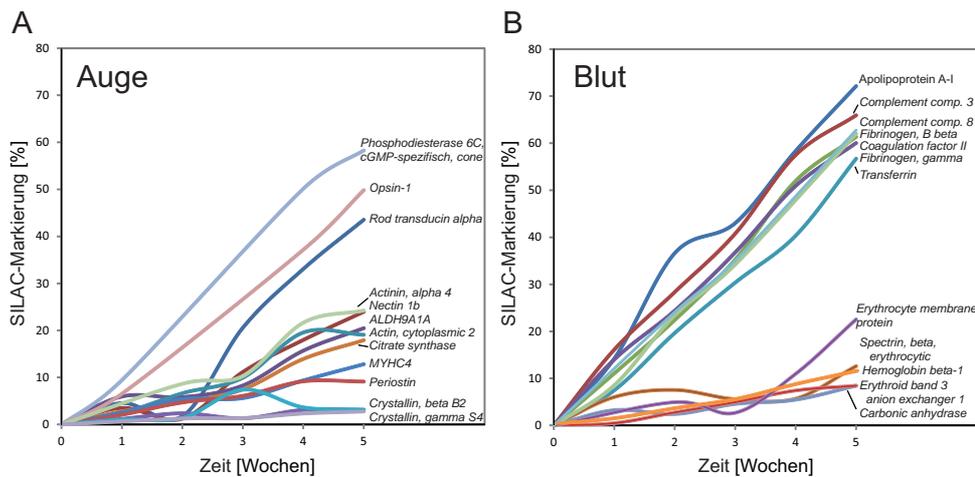


Abbildung 14.: Proteinumsatzraten im Auge (A) und im Blut (B). Die Markierungsraten verschiedener Proteine wurden gegen die Zeit aufgetragen.

der Schwanzflosse gelegt wurde.

Adulten Fischen wurden die Spitze der Schwanzflosse amputiert, um die Synthese des neuen Flossengewebes nach einer Woche mittels der partiellen SILAC-Markierung zu untersuchen. In Abbildung 15A ist die Durchführung schematisch dargestellt. Der distale Bereich der oberen Schwanzflosse wurde amputiert und die Fische anschließend für eine Woche mit dem SILAC-Fischfutter zweimal täglich gefüttert. Der nicht geschädigte Teil der unteren Flosse des selben Fisches diente als Kontrollgewebe, um die metabolische Inkorporation von Lysin-6 von der regenerationsspezifischen Inkorporation zu differenzieren. Nach einer Woche konnte deutlich das regenerierte Gewebe der amputierten Flosse nachgewiesen werden. In der Durchlichtaufnahme der Abbildung 15C ist der neusynthetisierte Bereich als helles Gewebe von der unbeschädigten Flosse gut zu unterscheiden. Deutlich sind die neugebildeten verknöcherten Flossenstrahlen (*Lepidotrichia*) (helle Bereiche) mit dem dazwischenliegenden weicheren Gewebe aus mesenchymalen Zellen (dunkle Bereiche) zu erkennen. Die sog. epimorphe Regeneration, also die vollständige Neusynthese von Knochen, Epidermis, Blutgefäßen und Nerven (Tal et al., 2010), war nach einer Woche fast vollständig abgeschlossen. Das Erreichen der endgültigen Form sowie die Pigmentierung sind im Vergleich zur Kontrollflosse noch nicht abgeschlossen.

Das regenerierte Flossengewebe sowie die Kontrollflosse wurden präpariert und in SDT-Puffer homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt, im Gel enzymatisch mit Lys-C verdaut und massenspektrometrisch analysiert (LC-MS/MS)

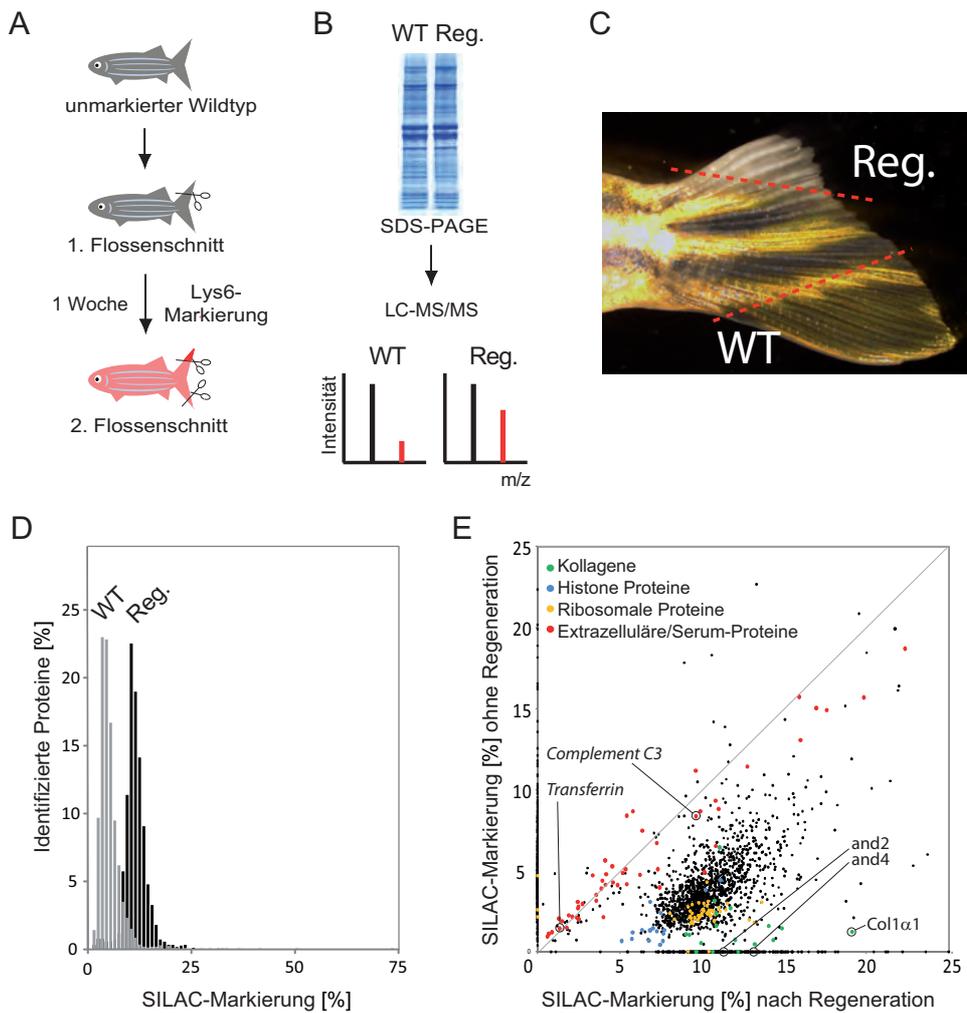


Abbildung 15.: Studie zur Flossenregeneration basierend auf der partiellen SILAC-Markierung. (A) Nach der Flossenamputation bei einem unmarkierten Wildtypfisch erfolgte die SILAC-Markierung für eine Woche. (B) Anschließend wurden die regenerierte Flosse und das Kontrollgewebe (C) präpariert und für die massenspektrometrische Analyse mittels SDS-PAGE und *in gel digest* verarbeitet, um die Lysin-6-Inkorporation zu detektieren. (D) Das Balkendiagramm zeigt die Markierungsraten der Proteine (X-Achse) vom regenerierten Gewebe (Reg., schwarz) und vom Kontrollgewebe (WT, grau) im Bezug auf die relative Häufigkeit (Y-Achse). (E) Gegenüberstellung der Markierungsraten von Proteinen aus regeneriertem (X-Achse) und unbeschädigtem (Y-Achse) Flossengewebe in einem Streudiagramm. Die diagonale Linie repräsentiert ein 1:1-Verhältnis der Markierungsraten in beiden Gewebeprobe. Proteingruppen unterschiedlicher Funktion oder Lokalisation sind farblich markiert und zeichnen sich durch deutlich höhere Markierungsraten im regenerativen Gewebe aus.

(Abbildung 15B). Aus beiden Geweben wurden insgesamt 2196 Proteine mit H/L - Ratio detektiert, die zu Markierungsraten (in %) verrechnet wurden (Kapitel 3.1). Das Balkendiagramm (Abbildung 15D) enthält die Häufigkeitsverteilung der Markierungsraten aller detektierten Proteine vom regenerierten Gewebe (schwarz) und vom unbeschädigten Gewebe (grau). Die mittlere SILAC-Markierungsrate im Kontrollgewebe beträgt 3%, im regenerierten Gewebe beläuft sie sich auf 10%. Die geringe Markierungsrate im unbeschädigten Gewebe nach einer Woche SILAC-Markierung spiegelt im Vergleich zu Organen wie der Leber (10%) und das Blut (8%) eine allgemein niedrige metabolische Aktivität oder eine geringe Zellproliferation des Flossengewebes wider (Kapitel 3.2.2, Abbildung 12). Im Gegensatz dazu wurde im regenerierten Flossengewebe eine dreifach höhere Lysin-6-Inkorporation als im Kontrollgewebe detektiert. Für einen besseren Vergleich beider Datensätze wurden die Markierungsraten der einzelnen Proteine aus dem regenerierten Gewebe (X-Achse) und dem Kontrollgewebe (Y-Achse) in einem Streudiagramm gegenübergestellt (Abbildung 15D). Jeder Punkt repräsentiert die Markierungsraten eines Proteins aus beiden Gewebeprobe. Auf der Diagonalen des Diagramms befinden sich Proteine, die sehr ähnliche Markierungsraten in beiden Geweben aufweisen. Hierbei handelt es sich verstärkt um sekretierte Proteine des Blutplasmas. Zum Beispiel zeigen Proteine des Komplementsystems (*Complement component C3-1*, *Complement component 9*) und Proteine von Erythrozyten (*Hemoglobin subunit beta-1*) (rote Datenpunkte) vergleichende Inkorporationsraten, weil diese Proteine nicht in der Schwanzflosse synthetisiert wurden.

Für die Mehrheit der quantifizierten Proteine wurde eine höhere Lysin-6-Inkorporation im regenerierten Gewebe detektiert. Im Streudiagramm ist die Mehrzahl der Proteine daher in Richtung der X-Achse verschoben. Exemplarisch wurden Proteingruppen farblich hervorgehoben, die eine deutlich höhere Markierungsrate im regenerativen Gewebe zeigen, wie z.B. Kollagene (grün, *Collagen type I alpha 1*), Histone (blau) und ribosomale Proteine (gelb). Diese Proteine weisen sowohl auf eine hohe Zellproliferation als auch auf einen hohen Anteil neusynthetisierter Strukturproteine im regenerierten Gewebe hin. Des Weiteren wurden Proteine identifiziert, die eine hohe Markierungsrate während der Regeneration aufweisen (bis zu 35%), aber nicht im Kontrollgewebe quantifiziert bzw. detektiert wurden. Zum Beispiel wurden *Actinodin 2* (and2) und *Actinodin 4* (and4) mit Markierungsraten von 13% bzw. 11% ausschließlich in der regenerativen Flosse detektiert. Diesen Proteinen konnte eine wichtige Funktion bei der Flossenregeneration zugeschrieben werden (Zhang et al., 2010).

Mit Hilfe der partiellen SILAC-Markierung kann der Modellorganismus *D. rerio* für die

Analyse globaler Veränderungen im Proteom während regenerativer Prozesse verwendet werden. Die Gruppierung von beteiligten Proteinen anhand ihrer Funktionen ermöglicht die Charakterisierung regenerativer Vorgänge sowie die Identifizierung neuer Proteine mit regenerationspezifischer Funktion.

3.2.4. Vollständige SILAC-Markierung des Zebrafisches in der F1-Generation

Nach der erfolgreichen Testung des SILAC-Futters sollte nun die vollständige Markierung der Fische erreicht werden. Eine konsequente Ernährung der Fische mit dem SILAC-Futter zweimal täglich und einer zusätzlichen Fütterung von frischem SILAC-Mausgewebe dreimal pro Woche erhöhte die Inkorporation von Lysin-6 nach einem Zeitraum von 3 Monaten auf 76%. In der Abbildung 16A (links) ist die Häufigkeitsverteilung der Markierungsraten aller detektierten Proteine nach einem Markierungszeitraum von 3 Monaten dargestellt. Durch die weiterhin konsequente SILAC-Fütterung stieg die durchschnittliche Markierungsrate nach 11 Monaten auf 85% (Abbildung 16A, Mitte links). Da die SILAC-Markierung der Zebrafische in einem Alter von 2 Monaten begonnen wurde, ist die Entwicklung schematisch mit einem Größenzuwachs der abgebildeten Fische dargestellt. Weiterhin wurde die zunehmende Markierungsrate mit einer stärkeren Rotfärbung symbolisiert.

Um die Inkorporation von Lysin-6 weiter zu steigern, wurden markierte Weibchen mit nicht-markierten Männchen der Linie BNA verpaart. Auf Grund der erfolgreichen Verpaarung ist davon auszugehen, dass die SILAC-Ernährung keinen wesentlichen Einfluss auf die Fruchtbarkeit genommen hat. Allerdings wurde eine leicht verringerte Anzahl überlebensfähiger Nachkommen beobachtet, da im Vergleich zu konventionell gefütterten Fischen in der hauseigenen Anlage die Überlebensrate der SILAC-Fische um etwa 10% sinkt.

In den Larven der ersten Filialgeneration (F1) wurde eine mittlere Markierungsrate von 90,6% detektiert (Abbildung 16A, Mitte rechts). Für die Versorgung der Larven ist auf Grund ihrer Größe (ca. 3-4 mm) ein Futter mit kleiner Partikelgröße notwendig. Die Herstellung eines entsprechenden SILAC-Futters auf Basis von Fliegenlarven ist in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Die Fütterung mit dem larvalen SILAC-Futter führte zu einem verzögerten Wachstum der Larven im Vergleich zu konventionell ernährten Zebrafischlarven (Abbildung 17A). In einem Alter von 8 Wochen hatten die SILAC-Larven eine durchschnittliche Körpergröße von 9 mm erreicht. Im Gegensatz dazu besaßen die Kontrolllarven zu diesem Zeitpunkt schon eine durchschnittliche Größe von 14,6 mm. Obwohl eine signifikante Re-

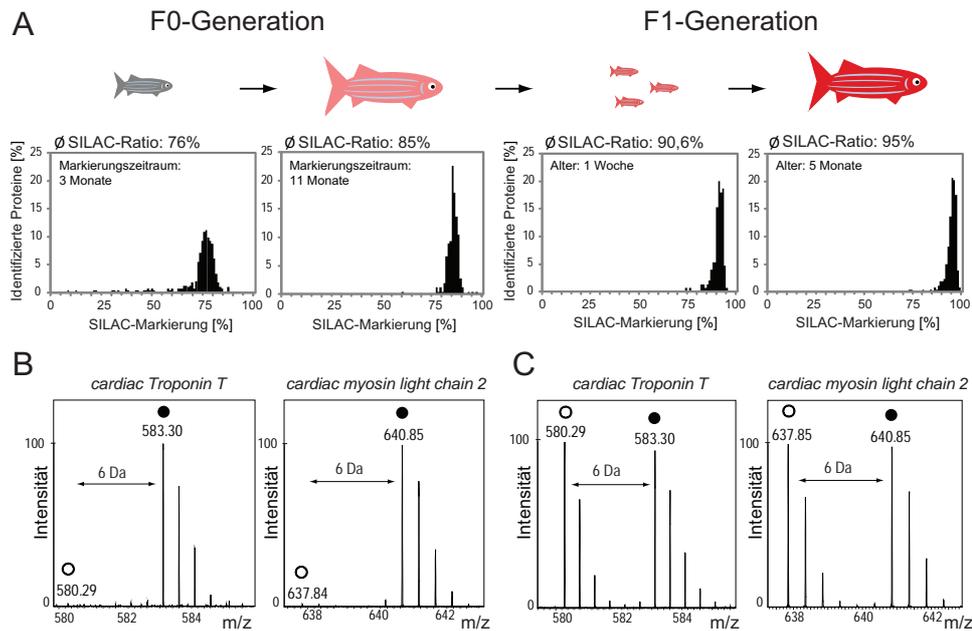


Abbildung 16.: Die vollständige Markierung der Zebrafische mit Lysin-6. (A) Nicht-markierte Zebrafische in einem Alter von 2 Monaten wurden konsequent zweimal täglich mit dem SILAC-Futter ernährt und im adulten Stadium verpaart. Die Markierungsraten der F0- und F1-Generation wurden in Balkendiagramme gegen die relative Häufigkeit (in %) aufgetragen. Mittlere Markierungsraten sind angegeben und werden durch eine zunehmende Rotfärbung der schematischen Fische symbolisiert. (B) Exemplarische MS-Spektren von herzspezifischen Proteinen der adulten F1-Generation zeigen eine Lysin-6-Inkorporation von über 96%. (C) Nach der Mischung von markiertem und unmarkiertem Herzgewebe zeigen die Peptidpaare eine SILAC-Ratio von 1:1.

duktion beim Wachstum zu beobachten war, führte die Fütterung mit dem SILAC-Futter zu einer deutlichen Steigerung der Markierungsrate in Fischlarven. In Abbildung 17B ist neben dem Wachstum der SILAC-Larven auch die Markierungsrate dargestellt. Unmarkierte Fischlarven wurden ab dem vierten Lebenstag mit SILAC-Futter ernährt und erreichten nach 6 Wochen eine Markierungsrate von über 80%. Um die verzögerte Entwicklung der Larven aus der F1-Generation in den ersten 6 Wochen zu kompensieren, wurde die Ernährung einmal pro Woche mit konventionellem Futter substituiert. Die daraus resultierende Abnahme der SILAC-Markierung ist in Abbildung 17C dargestellt. Nach 6 Wochen sank die mittlere Lysin-6-Inkorporation auf 76%. Anschließend erfolgte eine ausschließliche Ernährung mit dem SILAC-Futter, wodurch die Markierungsrate erneut anstieg und nach

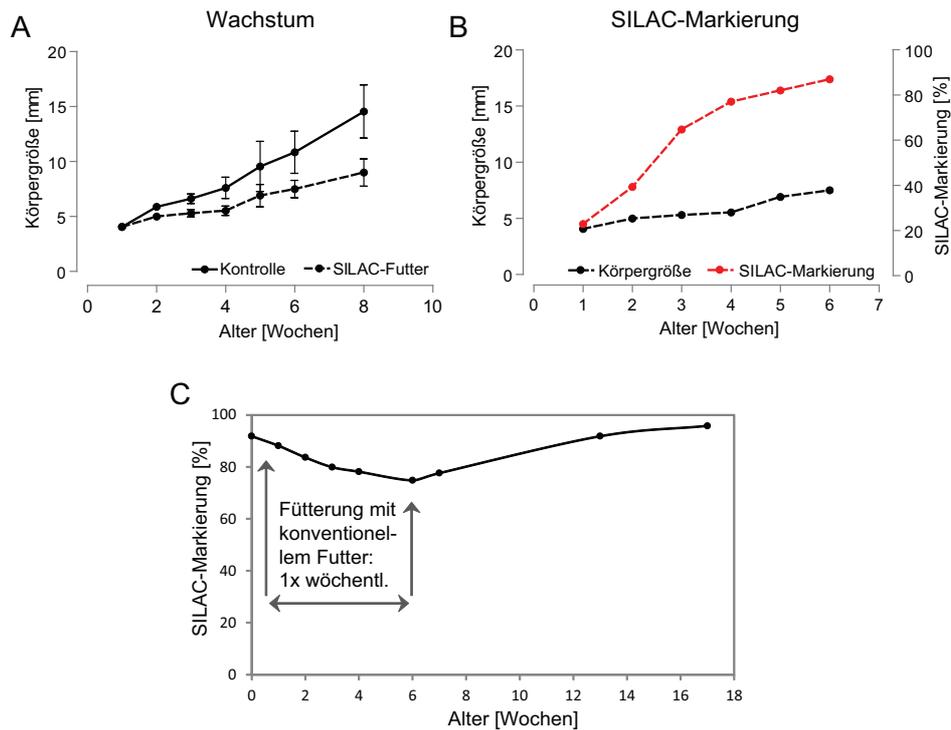


Abbildung 17.: Wachstum und Markierung der SILAC-Zebrafische. (A) Das Wachstum von Zebrafischlarven basierend auf der Ernährung mit konventionellem Futter (vollständige Linie) und SILAC-Futter (gestrichelte Linie). Jeder Zeitpunkt enthält die Daten von 10 Larven ($n=10$). Nach 8 Wochen beträgt die Körpergröße der konventionell ernährten Fische 14,6 mm (± 3 mm), die der SILAC-Ernährung 9 mm (± 2 mm). (B) Bei unmarkierten Larven steigt die Markierungsrate in den ersten Wochen deutlich bis über 80% an. (C) Suppletierung der SILAC-Ernährung mit konventionellem Fischfutter einmal pro Woche während der ersten 6 Wochen. Die SILAC-Markierungsrate sinkt während dieser Zeit auf 76%.

5 Monaten im adulten Zebrafisch 95% betrug (Abbildung 16A, links). Die vollständige SILAC-Markierung des Zebrafisches war somit erfolgreich.

Exemplarisch sind in Abbildung 16B MS-Spektren von herzspezifischen Peptiden dargestellt, welche die vollständige Lysin-6-Markierung in der adulten F1-Generation repräsentieren. Die SILAC-Ratio zwischen dem schweren (schwarzer Kreis) und dem leichten (weißer Kreis) Peptid der Proteine *cardiac Troponin T* und *cardiac myosin light chain 2* beträgt 1:28,4 bzw. 1:31, was einer Lysin-6-Inkorporation von 96,6% bzw. 96,9% entspricht. Vollständig markiertes und unmarkiertes Herzgewebe wurden anschließend in gleichen Mengen gemischt und massenspektrometrisch analysiert. Die resultierenden Peptidpaare spiegeln ein 1:1-Verhältnis wider (Abbildung 16C). Auch in anderen Organen wie z.B. der Ske-

lettmuskulatur, den Kiemen oder dem Gehirn wurde eine Markierungsrate von über 95% detektiert sowie in Proteinen mit langsamer Umsatzrate wie den Kristallinen (Anhang A Abbildung 38).

3.2.5. Hohe Präzision SILAC-basierender Proteinquantifizierung

Der nun vollständig Lysin-6-markierte Zebrafisch sollte als interner Standard für quantitative Proteomstudien verwendet werden. Um die Präzision der Proteinquantifizierung basierend auf dem SILAC-Zebrafisch zu validieren, wurde vollständig markiertes Herzgewebe der F1-Generation mit unmarkiertem Herzgewebe von Wildtypfischen der Linie BNA zu gleichen Teilen gemischt und massenspektrometrisch als technische und biologische Triplikate gemessen.

Für die Analyse technischer Triplikate wurden die Herzen eines adulten SILAC-Zebrafisches der F1-Generation und eines unmarkierten Wildtypfisches in einem Alter von 6 Monaten präpariert. Nachdem die Herzen in SDT-Puffer homogenisiert wurden, erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration, um die Proben in einem Verhältnis von 1:1 zu mischen. Die Mischung und anschließende enzymatische Spaltung mit Lys-C in Lösung erfolgte in drei parallelen Ansätzen. Alle drei Proben wurden nacheinander und unter den selben Bedingungen massenspektrometrisch analysiert, um sie als technische Triplikate auszuwerten. In der Abbildung 18A, E und I ist die Verteilung aller logarithmierten (\log_2) SILAC-Ratios der einzelnen Replikate als Dichtefunktion der Standardnormalverteilung dargestellt. Die technischen Replikate wurden als La, Lb und Lc bezeichnet und enthalten jeweils die Anzahl (n) an quantifizierten Proteinen: La (n = 323), Lb (n = 297) und Lc (n = 323). Die \log_2 SILAC-Ratios liegen auf der X-Achse und beschreiben eine gaußsche Normalverteilungskurve um den Wert null herum. Diese Normalverteilung spiegelt ein 1:1-Verhältnis der überwiegenden Mehrheit an Proteinen zwischen dem markierten und unmarkierten Proteom wider. Im nächsten Schritt wurde die Korrelation zwischen den Replikaten näher betrachtet. Dafür wurden die \log_2 SILAC-Ratios der einzelnen Wiederholungen einander in Streudiagrammen gegenübergestellt (Abbildung 18B, C und F). Die jeweils enge Verteilung der Datenpunkte auf der Diagonalen reflektiert die hohe Pearson-Korrelation (r) der SILAC-Ratios zwischen den Replikaten (r = 0,96; 0,93; 0,95). Diese Ergebnisse beschreiben eine sehr gute Reproduzierbarkeit der detektierten SILAC-Ratios und eine nur geringe technische Variabilität. Als nächstes wurden die Expressionsmuster der leichten Proteine zwischen den Replikaten untersucht. Dafür wurden direkte Ratios aus

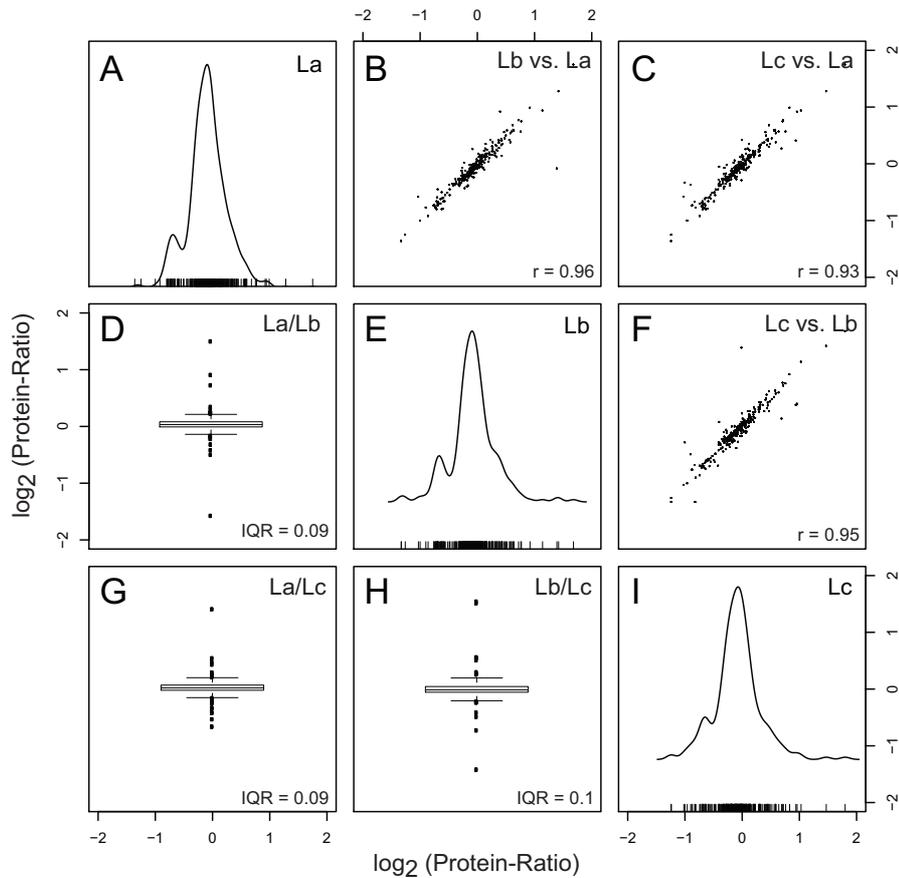


Abbildung 18.: Validierung der SILAC-Proteinquantifizierung anhand von technischen Triplikaten. Proteinproben eines unmarkierten und eines markierten Herzens wurden parallel in 3 Ansätzen im Verhältnis 1:1 gemischt und massenspektrometrisch analysiert. Die detaillierte Auswertung ist im Text erläutert.

den SILAC-Ratios der einzelnen Proteine berechnet. D.h., die SILAC-Ratio eines Proteins aus der Probe La wurde durch die SILAC-Ratio des gleichen Proteins aus der Probe Lb dividiert. Die Wertigkeit des schweren Standards wird dabei eliminiert und die berechneten direkten Ratios beschreiben das Expressionsverhältnis der leichten Proteine zwischen den Proben La und Lb. Die Verteilung dieser direkten Ratios aller Proteine zweier Replikate sind in den Boxplots in Abbildung 18D, G und H dargestellt. Die mittleren 50% aller Daten liegen in der Box, dessen Länge (Interquartilsabstand, *interquartile range*, IQR) den Streuungsgrad der Daten reflektiert. Zwischen den technischen Replikaten liegt der IQR bei ca. 0,1. Diese sehr enge Verteilung der berechneten direkten Ratios zwischen technischen

Replikaten spiegelt ebenfalls die hohe Genauigkeit der Messungen und die Reproduzierbarkeit der Proteinquantifizierung wider. Des Weiteren konnten die detektierten Ausreißer, die in den Boxplots außerhalb der Whiskers liegen, nicht in allen drei Replikaten mit einer Expressionsveränderung vom Faktor 2 bestätigt werden.

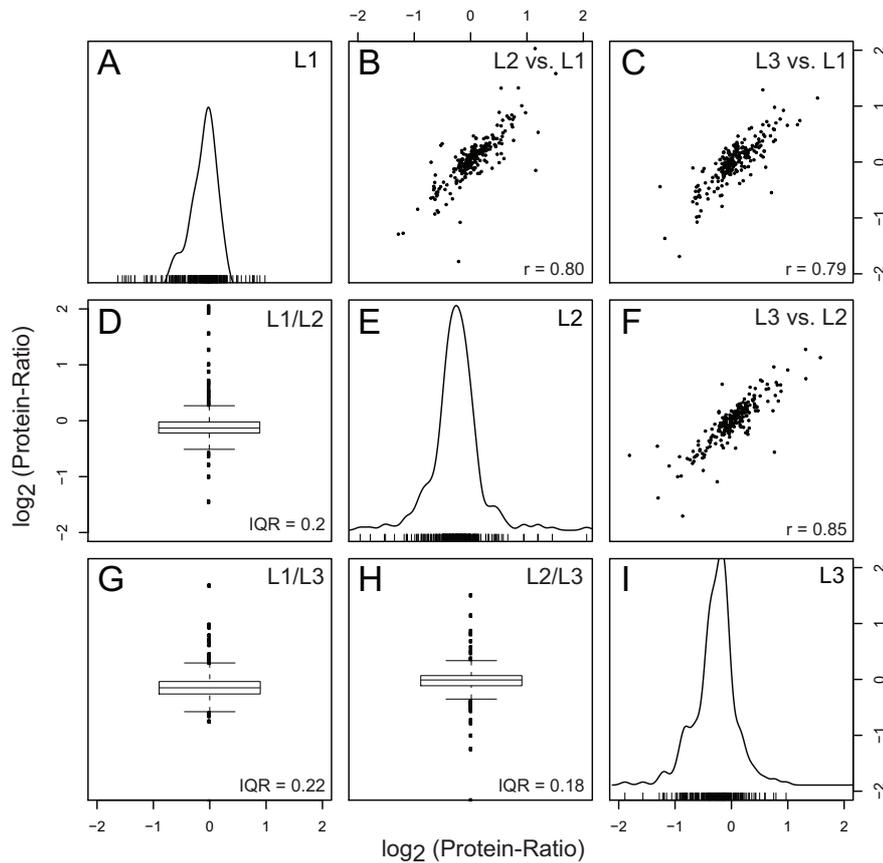


Abbildung 19.: Validierung der SILAC-Proteinquantifizierung anhand von biologischen Triplikaten. Proteinproben von 3 unmarkierten Herzen wurden jeweils im Verhältnis 1:1 mit einer markierten Proteinprobe der F1-Generation gemischt und massenspektrometrisch analysiert. Die detaillierte Auswertung ist im Text erläutert.

Als nächstes erfolgte die Validierung der SILAC-Proteinquantifizierung mittels biologischer Triplikate, indem die biologische Variabilität zwischen verschiedenen Individuen bestimmt wurde. Dafür wurden die Herzen von drei adulten Wildtypfischen präpariert und in STD-Puffer homogenisiert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte die Mischung der leichten Herzproben mit der Proteinprobe des adulten SILAC-Herzens

in einem Verhältnis von 1:1. Die Proben wurden enzymatisch mit Lys-C verdaut und massenspektrometrisch unter den gleichen Bedingungen analysiert. Die Auswertung der biologischen Triplikate erfolgte wie die Auswertung der technischen Triplikate (siehe oben). Die Verteilung der \log_2 SILAC-Ratios der einzelnen Triplikate wurde ebenfalls als Dichtefunktion der Standardnormalverteilung in der Abbildung 19A, E und I dargestellt, welche die Proben L1 ($n = 347$), L2 ($n = 327$) und L3 ($n = 301$) enthalten. Die Normalverteilung der \log_2 SILAC-Ratios reflektiert ein 1:1-Verhältnis zwischen den markierten und unmarkierten Proteinen, die durch eine gaußsche Normalverteilungskurve um den Wert null herum gezeigt wird. Die Streudiagramme der Abbildung 19B, C und F enthalten die Gegenüberstellung der \log_2 SILAC-Ratios der einzelnen Replikate. Im Gegensatz zu den technischen Replikaten ist die Pearson-Korrelation etwas geringer ($r = 0,80; 0,79; 0,85$), was durch die nicht so enge Verteilung der Datenpunkte auf der Diagonalen ersichtlich wird. Anschließend wurden direkte Ratios aus den SILAC-Ratios der einzelnen Protein zwischen zwei biologischen Replikaten berechnet, um die Expressionsverhältnisse der leichten Proteine zu bestimmen. Die Verteilung der direkten Ratios ist in den Boxplots der Abbildung 19D, G und H dargestellt. Die IQRs, die den Streuungsgrad der mittleren 50% der Daten reflektieren, befinden sich zwischen 0,18 und 0,22. Im Vergleich zu den technischen Triplikaten streuen die direkten Ratios der biologischen Wiederholungen etwa um den Faktor 2. Diese Ergebnisse spiegeln wider, dass die biologische Varianz zwischen zwei Individuen doppelt so hoch ist wie die Varianz zwischen technischen Replikaten. Des Weiteren konnten die detektierten Ausreißer zwischen den biologischen Wiederholungen, die in den Boxplots außerhalb der Whiskers liegen, nicht in allen drei Replikaten mit einer Expressionsveränderung vom Faktor 2 bestätigt werden. Somit konnten keine Proteine detektiert werden, die zwischen dem Herzproteom der SILAC-Zebrafische und der unmarkierten Fische mehr als zweifach reguliert vorliegen.

Zusammenfassend gilt zu bemerken, dass die Korrelation zwischen technischen sowie biologischen Wiederholungen sehr hoch liegt. Die statistische Genauigkeit der Proteinquantifizierung basierend auf dem SILAC-Zebrafisch befindet sich somit auf dem Niveau von SILAC-Studien in Zellkultur und anderen Organismen (Geiger et al., 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Proteinexpression im Herzen zwischen dem SILAC-Zebrafisch und den unmarkierten Wildtypen vergleichbar ist und daher keine Unterschiede in der Zell- oder Gewebezusammensetzung vorhanden sind.

3.3. Quantitative Proteomstudie der embryonalen Herzentwicklung in Zebrafischen

Um zu validieren, ob der SILAC-Zebrafisch als interner Proteinstandard für eine globale Proteinquantifizierung verwendet werden kann, wurden die Proteomveränderungen während der embryonalen Herzentwicklung im Fisch näher betrachtet. Wie bereits im Kapitel 1.3 beschrieben, diente der Zebrafisch bereits mehrfach als Modellorganismus für die Aufklärung grundlegender Entwicklungsprozesse. Bisherige Proteinstudien über die embryonale Herzentwicklung im Fisch basierten vor allem auf der Identifikation von Proteinen, die an der Herzmorphogenese beteiligt sind. In der vorliegenden Studie sollte nun eine globale Quantifizierung der Proteine mit Hilfe des SILAC-Zebrafisches erfolgen.

3.3.1. Durchführung der embryonalen Herzstudie

Für die vorliegende Studie wurde die Zebrafischlinie *Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* verwendet (D'Amico et al., 2007), um embryonale Herzen zum Zeitpunkt 72 und 120 Stunden nach der Befruchtung (*hours post fertilisation*, hpf) zu isolieren. Die Fische zeichnen sich durch ein grün-fluoreszierendes Herz aus und eignen sich daher sehr gut zur Isolierung von embryonalen Herzen. Die spezifische kardiale Fluoreszenzmarkierung resultiert aus der Expression des grün-fluoreszierenden Proteins (*green fluorescent protein*, GFP), welches unter der Kontrolle des Promotors vom *cardiac myosin light chain 2*-Gen (*cmlc2*; *myl7*) liegt. Die Aktivität des *cmlc2*-Promotors beginnt zum Zeitpunkt 16 hpf und bleibt anschließend konstant, da die GFP-Expression auch im adulten Fisch detektiert werden konnte (Huang et al., 2003). Wie in Kapitel 2.10.4 beschrieben, werden die Zebrafische im Alter von 72 und 120 hpf anästhesiert, nach positivem GFP-Signal im Herzen sortiert und mittels mehrmaliger Resuspendierung mechanisch aufgebrochen (Abbildung 20A). Da bei Zebrafischen das Herz in einem leicht zugänglichen Pericard dorsal am hinteren Kopfbereich liegt, reichen leichte mechanische Scherkräfte aus, um das Pericard zu öffnen und das Herz zu isolieren. Dabei wird die Integrität des Herzens kaum beeinflusst und die Morphologie bleibt erhalten (Abbildung 20A). Etwa 400 Herzen pro Zeitpunkt wurden vereinigt und in SDT-Puffer homogenisiert. Da ein embryonales Zebrafischherz ca. 300 differenzierte Kardiomyozyten (de Pater et al., 2009) und weitere Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten oder neuronale Zellen enthält, resultiert die Herzisolierung nur in einer kleinen Probenmenge, die nach der kompletten Zellyse eine Proteinmenge von ca. 20 µg ergibt.

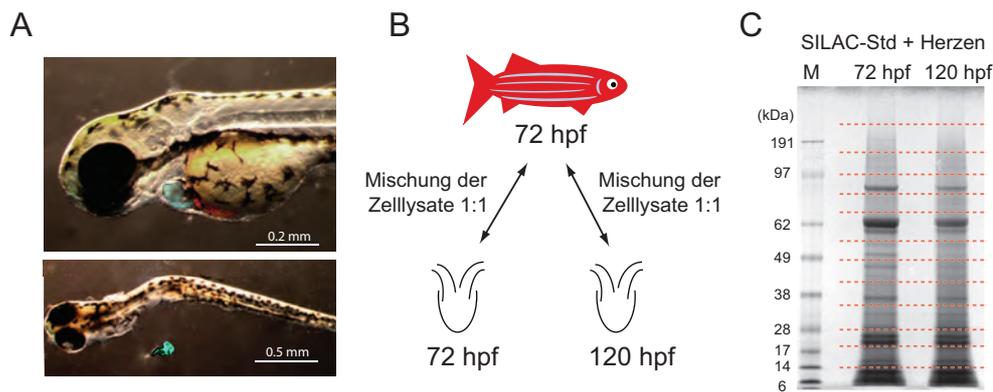


Abbildung 20.: Durchführung der Studie zur embryonalen Herzentwicklung. (A) Die Isolierung embryonaler Herzen erfolgte mit Zebrafischen der Linie *Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* zu den Zeitpunkten 72 und 120 hpf. Durch mechanische Scherkräfte werden die Herzen aus den Embryonen isoliert, ohne die Morphologie der Herzen zu beeinträchtigen. (B) Für die quantitative Proteomanalyse wurden die unmarkierten Herzproben beider Zeitpunkte mit einer markierten Probe von SILAC-Embryonen zu gleichen Anteilen gemischt und massenspektrometrisch analysiert. (C) Die Proben beider Zeitpunkte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und jeweils für den *in gel digest* in 13 Gelbänden geschnitten. Die 26 Proben wurden anschließend einzeln massenspektrometrisch analysiert.

Um die zwei Zeitpunkte der embryonalen Herzentwicklung miteinander zu vergleichen, wurden die unmarkierten Proben der isolierten Herzen mit einer Probe von vollständigen SILAC-Embryonen im Alter von 72 hpf in einem Verhältnis von 1:1 gemischt (Abbildung 20B). Die Lysin-6-markierten Proteine der SILAC-Embryonen dienen dabei als interner Standard für die Proteinquantifizierung. Da die SILAC-Embryonen zu der Linie BNA gehören, exprimieren sie kein GFP im Herzen und können daher nicht für die Herzisolierung verwendet werden. Die Mischung der unmarkierten Herzproben erfolgte daraufhin mit einer markierten Probe vollständiger SILAC-Embryonen, die in SDT-Puffer homogenisiert wurden. Anschließend wurden die Proteinproben in zwei parallelen Ansätzen weiterverarbeitet. Im ersten Ansatz wurden die Proben der zwei Zeitpunkte enzymatisch mit Lys-C in Lösung verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Im zweiten Ansatz wurden die Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und anschließend im Gel enzymatisch mit Lys-C verdaut. Hierfür wurden die Gelspuren der beiden Proben jeweils in 13 Bänden geschnitten und einzeln verdaut (Abbildung 20C), um die Komplexität der Proteinproben zu verringern und somit die Detektion von niedrig abundanten Proteinen zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die massenspektrometrische Analyse der insgesamt 26 Proben mit dem LTQ-Orbitrap Velos-Instrument (LC-MS/MS) jeweils mit einem 150

min-Gradienten, wofür eine Messzeit von insgesamt 65 Stunden benötigt wurde. Die MS-Rohdaten wurden mittels der MaxQuant software verarbeitet (Kapitel 2.14.3) und für die beiden Zeitpunkte gemeinsam ausgewertet.

3.3.2. Zunehmende Differenzierung subzellulärer Strukturen von Kardiomyozyten zwischen 72 und 120 hpf

Für die Zeitpunkte konnten 1653 Proteine (72 hpf) bzw. 1675 Proteine (120 hpf) mit SILAC-Ratio detektiert werden. Die Verteilung der einzelnen Ratios ist in Abbildung 21A und B für beide Zeitpunkte dargestellt. Die Streudiagramme enthalten die logarithmierten SILAC-Ratios, die gegen die Peak-Intensität aufgetragen wurden. Das Farbschema der Datenpunkte reflektiert den jeweiligen intensitätsabhängigen Signifikanzwert (*significance B*) der SILAC-Ratios (Cox und Mann, 2008). Dieser Wert gibt an, ob einzelne Ratios außerhalb der Normalverteilung aller SILAC-Ratios liegen. Die Signifikanz dieser sog. Ausreißer wird mit dem entsprechend Farbcode angegeben. Schwarze Datenpunkte beschreiben Proteine, die einen Signifikanzwert über 0,05 besitzen und daher zwischen dem markierten Standard und der unmarkierten Herzprobe vergleichbare SILAC-Ratios aufweisen. Die Mehrheit der quantifizierten Proteine (72 hpf: 84%; 120 hpf: 86%) ist dieser Gruppe zugehörig und liegt im Streudiagramm gruppiert um den Wert null. Farbige Datenpunkte symbolisieren Proteine mit einem Signifikanzwert zwischen 0,01 und 0,05 (grün), zwischen 0,001 und 0,01 (gelb) und unter 0,001 (rot). Insgesamt wurden 16% (72 hpf) bzw. 14% (120 hpf) der Proteine mit einer signifikant unterschiedlichen Expression zwischen vollständigen SILAC-Embryonen und isolierten Herzen detektiert. Im Alter von 72 hpf besitzen Zebrafischembryonen bereits eine ausgereifte Muskulatur, die sich beginnend vom Kopf durch den gesamten Rumpf erstreckt und einen großen Anteil an der Körpermasse stellt. Daher basiert die geringe Differenz zwischen dem Proteom isolierter Herzen und vollständiger Embryonen auf den vergleichbaren Charakteristika der Skelett- und Herzmuskulatur.

Um beide Zeitpunkte der embryonalen Herzentwicklung miteinander zu vergleichen, wurden direkte Ratios aus den H/L - Ratios berechnet. Grundlage dafür sind SILAC-Ratios von Proteinen, die in beiden Zeitpunkten detektiert wurden. 1398 Proteine konnten in beiden Experimenten quantifiziert werden (Abbildung 21C). Für diese Anzahl an Proteinen konnte eine direkte Ratio berechnet werden, indem die SILAC-Ratio vom Zeitpunkt 72 hpf durch die SILAC-Ratio von 120 hpf dividiert wurde. Die Wertigkeit des internen Standards wird dabei eliminiert und das Expressionsverhältnis des jeweiligen Proteins zwischen

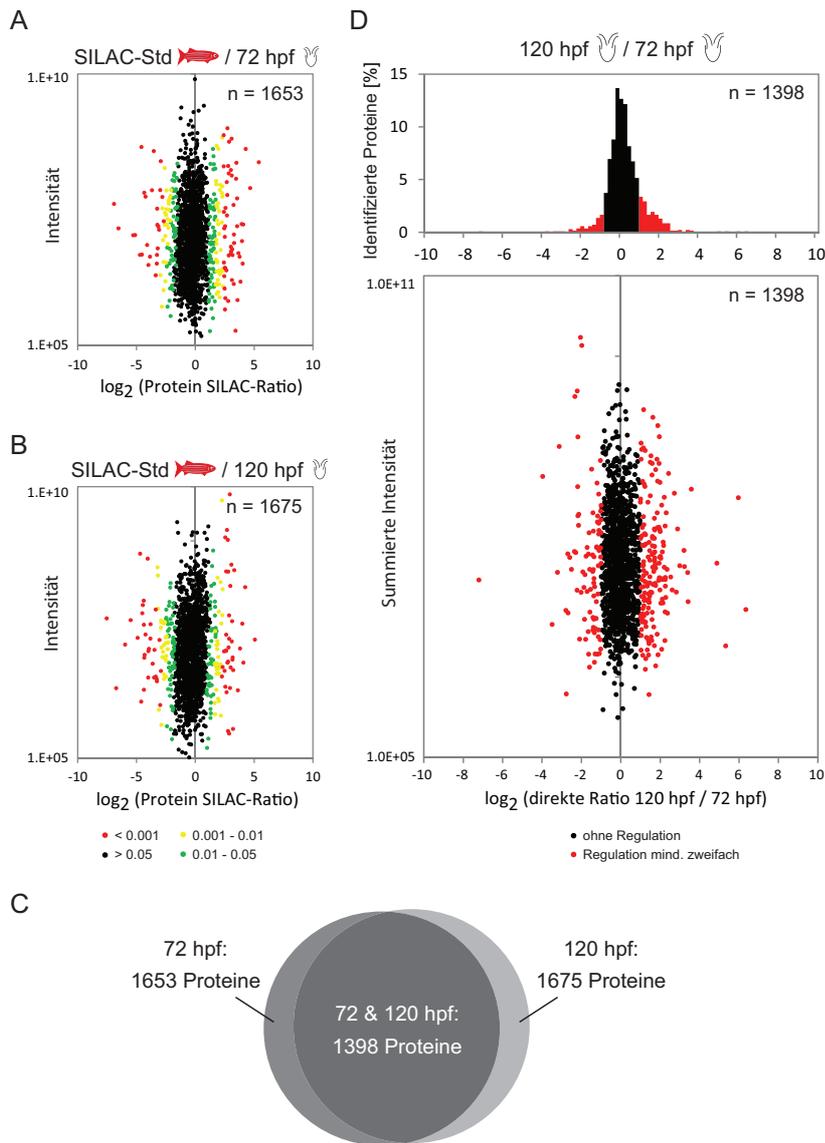


Abbildung 21.: Ergebnisse der SILAC-Studie zur embryonalen Herzentwicklung. (A) Streudiagramm der 1653 SILAC-Ratios (\log_2) zwischen der unmarkierten Herzprobe 72 hpf und dem schweren Standard. Die Ratios sind gegen die Intensität aufgetragen und Signifikanzwerte (*significance B*) sind farbig markiert. (B) Streudiagramm der 1675 SILAC-Ratios (\log_2) zwischen der unmarkierten Herzprobe 120 hpf und dem schweren Standard. (C) Relation zwischen den quantifizierten Proteinen der Proben 72 hpf und 120 hpf. (D) Histogramm und Streudiagramm der 1398 Proteine, die in beiden Zeitpunkten quantifiziert wurden. Proteine in schwarz zeigen keine Regulation zwischen 72 und 120 hpf. Rote Datenpunkte repräsentieren Proteine mit einer zweifachen Regulation zwischen den Entwicklungsstadien.

beiden Zeitpunkten wird durch die direkte Ratio wiedergegeben:

$$H/L (72 \text{ hpf}) \div H/L (120 \text{ hpf}) = {}^{120 \text{ hpf}}/{}_{72 \text{ hpf}}$$

Die Verteilung der 1398 logarithmierten direkten Ratios ist in Abbildung 21D im Histogramm dargestellt. Die Normalverteilung der Datenpunkte um den Wert null in Form einer gaußschen Normalverteilungskurve spiegelt wider, dass die Mehrheit der Proteine ein Expressionsverhältnis von 1:1 zwischen den Herzen vom Zeitpunkt 72 und 120 hpf besitzen. Auch das Streudiagramm der Abbildung 21D zeigt die Gruppierung der direkten Ratios um den Wert null. Alle schwarzen Datenpunkte stehen für Proteine, die nicht zwischen den beiden Zeitpunkten der Herzentwicklung reguliert sind. Proteine mit einer Regulation von mindestens zweifach wurden in rot abgebildet. Dabei handelt es sich um 172 Proteine ($\cong 12,3\%$), die zum Zeitpunkt 120 hpf reguliert sind ($\log_2 \text{ Ratio} \geq 1$) und um 86 Proteine ($\cong 6,2\%$), die eine Regulation zum Zeitpunkt 72 hpf ($\log_2 \text{ Ratio} \leq -1$) zeigen.

In Abbildung 22A sind Beispielspektren von Proteinen mit und ohne Regulation zwischen den Entwicklungsstadien gezeigt. Die MS-Spektren des Proteins *L-lactate dehydrogenase B chain* zeigen zu beiden Zeitpunkten das gleiche 1:2-Verhältnis zwischen schwerem und leichtem Peptid (H/L - Ratio). Das Protein ist daher nicht reguliert. Als Beispiel für eine stärkere Expression zum frühen Entwicklungszeitpunkt sind die MS-Spektren von PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) abgebildet. Es konnte gezeigt werden, dass PCNA an der Kontrolle der DNA-Replikation beteiligt ist (Burkovics et al., 2009). Zum Zeitpunkt 72 hpf liegt ein 1:1-Verhältnis zum schweren Standard vor. Nach 120 hpf sinkt die Expression von PCNA auf ein Verhältnis von etwa 2:1 (H/L - Ratio), was einer zweifachen Abnahme entspricht. Um die entwicklungsbiologischen Veränderungen auf systembiologischer Ebene zu studieren, wurde eine Analyse basierend auf den GO (*Gene Ontology*)-Termen vorgenommen. Mit Hilfe des *ResA*-Programms (*Resampling Analysis of Arbitrary Annotations*, ResA), das in unserem Haus entwickelt wurde, konnten die signifikanten Anreicherungen bestimmter GO-Terme basierend auf den SILAC-Ratios in den Datensätzen 72 und 120 hpf berechnet werden (Ruhs et al., In Revision). Für den früheren Zeitpunkt ergab die Analyse u.a. eine Anreicherung der Terme DNA-Replikation, Regulation der Transkription und Regulation der Translation. Die Heatmap in Abbildung 22B zeigt die Ergebnisse der GO-Analyse basierend auf GO-Termen für biologische Prozesse (GOBP). Die Spalten enthalten die Anreicherung der GOBP-Terme basierend auf den \log_2 SILAC-Ratios der Zeitpunkte 72 und 120 hpf. Eine grüne Färbung symbolisiert eine mittlere Ratio des entsprechenden GOBP-Terms kleiner als null und daher eine Anreicherung der zugehörigen Proteine im

3. Ergebnisse

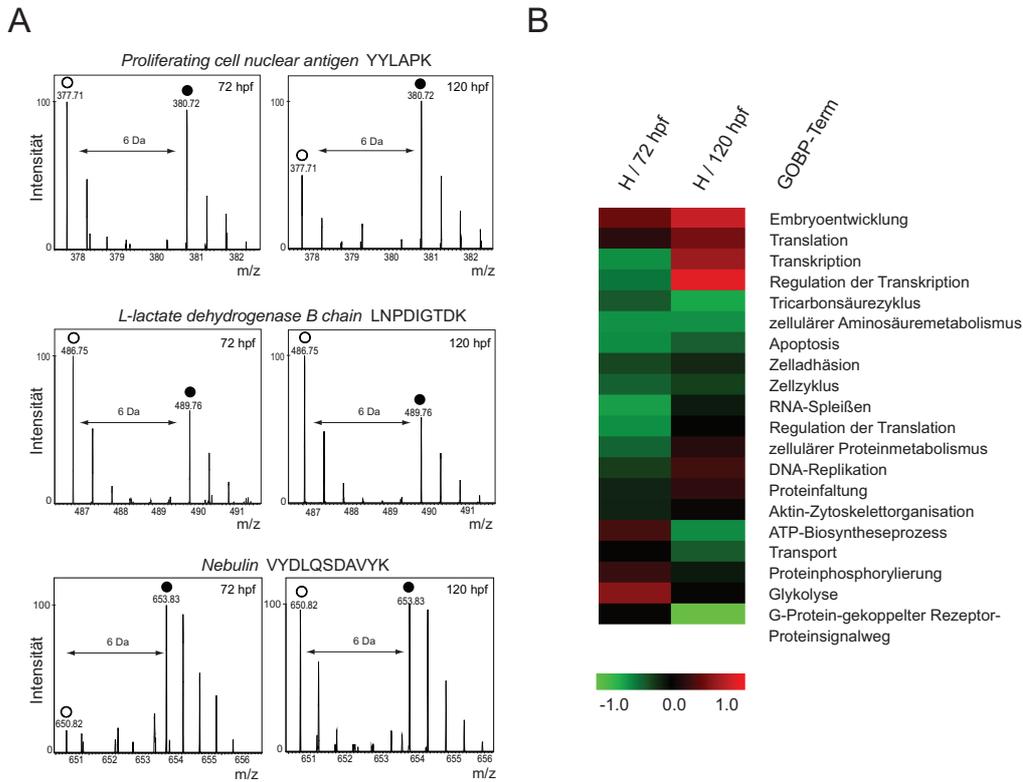


Abbildung 22.: Ergebnisse der SILAC-Studie zur embryonalen Herzentwicklung. (A) Exemplarische MS-Spektren von Proteinen mit einer Anreicherung zum Zeitpunkt 72 hpf (PCNA), ohne Regulation (*L-lactate dehydrogenase B chain*) und mit einer stärkeren Expression nach 120 hpf (*Nebulin*). (B) Die Heatmap repräsentiert die Anreicherung von GOBP-Termen zwischen dem schweren Standard und 72 hpf (H / 72 hpf) sowie zwischen dem schweren Standard und 120 hpf (H / 120 hpf) basierend auf \log_2 SILAC-Ratios. Die grüne Färbung symbolisiert eine mittlere Ratio des GOBP-Terms kleiner als null und daher eine Anreicherung der zugehörigen Proteine im Vergleich zum schweren Standard.

Vergleich zum schweren Standard. Aus dem Vergleich zwischen H/72 und H/120 hpf lassen sich Expressionsunterschiede der dem GOBP-Term assoziierten Proteine ableiten. Weitere charakteristische GOBP-Terme für den Zeitpunkt 72 hpf sind RNA-Spleißen und embryonale Entwicklung. Zusammenfassend weist der frühe Entwicklungszeitpunkt basierend auf der GO-Analyse eine erhöhte Zellproliferation und eine allgemein hohe morphogenetische Regulation auf.

Exemplarisch für ein Protein mit stärkerer Abundanz zum Zeitpunkt 120 hpf sind die MS-Spektren von Nebulin dargestellt (Abbildung 22A). Nach 72 hpf zeigt das Isotopen-

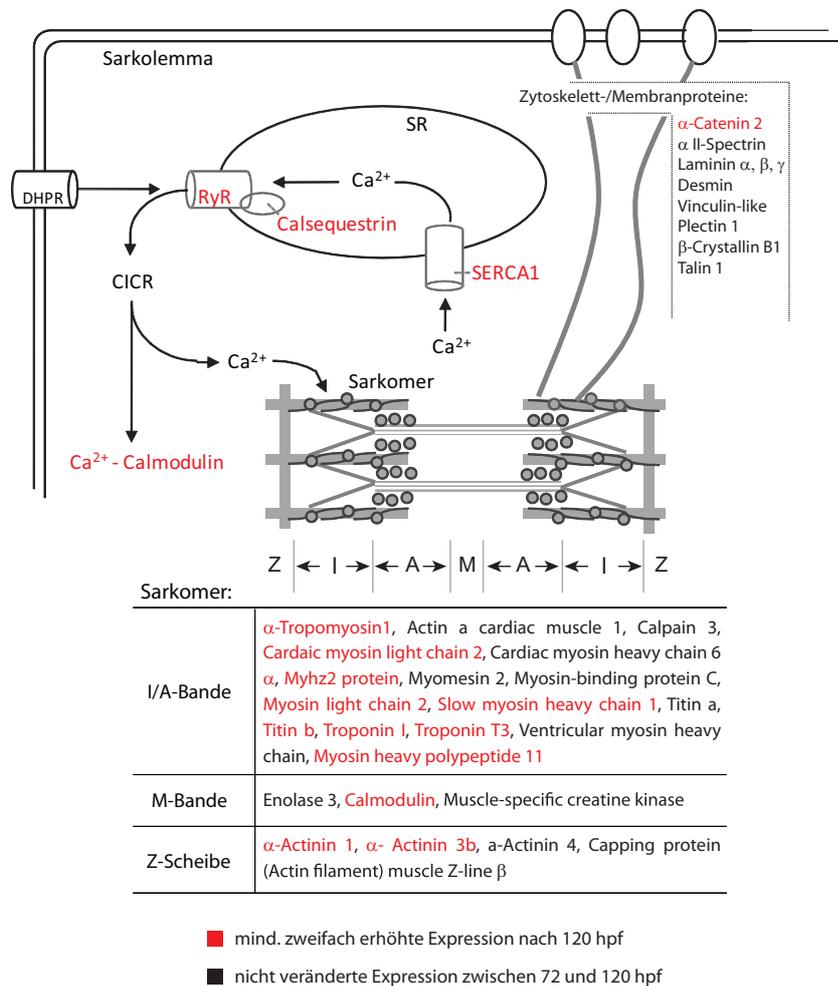


Abbildung 23.: Schematische Darstellung der kardialen Kontraktion mit identifizierten Proteinen aus der vorliegenden Studie. Schwarz-markierte Proteine zeigen keine Regulation. Proteine, die in rot dargestellt sind, zeigen zum Zeitpunkt 120 hpf eine mindestens zweifache Regulation und gehören subzellulären Strukturen wie dem kontraktilem Apparatur und dem sarkoplasmatischen Retikulum an. Die Werte sind im Anhang in Tabelle 1 aufgelistet.

muster des leichten Peptids im MS-Spektrum eine deutlich schwächerer Intensität im Vergleich zum schweren Standard. Zum Zeitpunkt 120 hpf ist ein 1:1-Verhältnis zu sehen, was einer dreifachen Zunahme gegenüber dem frühen Entwicklungsstadium entspricht. Die GO-Analyse zur Anreicherung von GOBP-Termen für den Zeitpunkt 120 hpf ist in der Abbildung 22B dargestellt. Eine Anreicherung der Terme wie ATP-biosynthetischer Pro-

zess, Transport und Glykolyse ist durch eine stärkere Grünfärbung im Vergleich zu den Daten des Zeitpunktes 72 hpf zu erkennen. Diese Ergebnisse spiegeln einen hohen Energiebedarf des Herzens zum späteren Entwicklungszeitpunkt wider. Charakteristisch für die Gruppe der 172 Proteine, die zum Zeitpunkt 120 hpf hochreguliert sind, ist die hohe Anzahl struktureller Muskelproteine und Proteine des Calciumsignalweges. Um die Proteine auch anhand ihrer Beteiligung an Signalwegen näher zu charakterisieren, wurden die sog. KEGG-Signalwege (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) verwendet (Kanehisa und Goto, 2000). In Abbildung 23 ist schematisch ein Netzwerk aus Proteinen der kardialen Kontraktion dargestellt, welches in Anlehnung an den KEGG-Signalweg *cardiac muscle contraction* erstellt wurde (<http://www.genome.ad.jp/kegg/map04260>), aber ausschließlich Proteine aus der vorliegenden Studie erhält. Proteine, die in schwarz abgebildet wurden, zeigen keine Regulation zwischen den Entwicklungsstadien. Rote Proteine sind dagegen mindestens zweifach zum Zeitpunkt 120 hpf hochreguliert. Dabei handelt es sich z.B. um Calcium-bindende Proteine (*Calsequestrin*), Calciumkanäle (*ryanodine receptor*, RyR) und Calciumpumpen (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*, SERCA) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), sowie um strukturelle Proteine der Sarkomere wie z.B. *α -Tropomyosin 1*, *Troponin T3* oder *α -Actinin 1*. Diese Ergebnisse weisen auf eine verstärkte Differenzierung und Entwicklung subzellulärer Strukturen der Kardiomyozyten während der Morphogenese zwischen 72 und 120 hpf hin. Der kontraktile Apparat sowie das sarkoplasmatische Retikulum reifen und erhalten ihre Funktionalität, wodurch auch der Energiebedarf steigt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe des SILAC-Zebrafisches Unterschiede während der Morphogenese des Herzens aufgedeckt und verschiedenen Entwicklungsstadien charakterisiert werden können. Der SILAC-Fisch eignet sich daher als interner Proteinstandard für globale, quantitative Proteomstudien.

3.4. Quantitative Proteomstudie des Morpholino-basierenden ALCAM-*knockdowns* in Zebrafischen

Wie in Kapitel 3.3 gezeigt wurde, konnte mit Hilfe des SILAC-Zebrafisches als interner Proteinstandard die embryonale Herzentwicklung auf Proteinebene quantitativ analysiert werden. Im nächsten Abschnitt sollte eine quantitative Proteomstudie zur Charakterisierung von Zebrafischen erfolgen, bei denen das *activated leukocyte cell adhesion molecule* (ALCAM) durch einen Morpholino-basierenden *knockdown* inaktiviert wurde.

Das Transmembranprotein ALCAM spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und der neuronalen Entwicklung, sowie bei der Morphogenese der Augen und der Schwimmblase (Diekmann und Stuermer, 2009; Choudhry et al., 2011). Des Weiteren wird eine Funktion von ALCAM während der Herzentwicklung vermutet. Hinweise darauf liefert der Funktionsverlust des Proteins im Krallenfrosch, was zu einer gestörten Herz-Morphogenese führt (Gessert et al., 2008). Für den gezielten *knockdown* im Zebrafisch erfolgte die Injektion von 8 ng eines spezifischen Morpholinos gegen die ALCAM-mRNA, um die Translation des Proteins zu blockieren. Die Sequenzen der Morpholinos sowie die Durchführung der Injektion in befruchtete Oozyten im Einzell- bis Zweizellstadium ist in Kapitel 2.10.5 erläutert. Die positiven ALCAM-Morphanten (Alc-MO) wiesen einen einheitlichen, herzspezifischen Phänotyp auf. Das Perikard war durch ein Ödem stark gedehnt und der *Looping*-Prozess zwischen Atrium und Ventrikel blieb unvollständig. Beide Herzkammern waren langgestreckt und etwas kleiner im Vergleich zu den Wildtypen. Außerdem verlief die Kontraktion des Herzens schwach und langsam, oft auch arhythmisch. Neben dem Herz-Phänotyp zeichnen sich ALCAM-Morphanten durch eine etwas geringere Körpergröße und kleinere Augen aus (Abbildung 24A).

3.4.1. ALCAM-Morphanten weisen eine verzögerte Differenzierung der Retina auf

Um den Morpholino-basierenden *knockdown* von ALCAM zu überprüfen, wurden spezifische *Whole-mount*-Antikörperfärbungen gegen ALCAM mit dem Antikörper zn-8 und einem Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper durchgeführt (Kapitel 2.15.1). In Abbildung 24A sind die Färbungen eines nicht-injizierten Embryos (Wildtyp, WT) und eines Embryos nach ALCAM-Morpholino-Injektion (Alc-MO), beide zum Zeitpunkt 72 hpf, dargestellt. Beide Fluoreszenzaufnahmen erfolgten bei gleicher Belichtungsdauer. Im Wildtyp-

Embryo ist deutlich die spezifische Färbung von ALCAM im Herzen (Pfeil), im Auge und in neuronalen Strukturen im Bereich der Wirbelsäule zu erkennen. Im unteren Bereich der Abbildung 24A ist der ALCAM-Morphant dargestellt, der durch sein stark vergrößertes Perikard (Pfeil) in der Durchlichtaufnahme vom Wildtyp klar zu unterscheiden ist. In der Fluoreszenzaufnahme zeigt der Morphant keine spezifische Färbung des Herzen (Pfeil) oder neuronaler Strukturen. Lediglich leichte Signale im Auge sind zu erkennen. Auf Grund der Antikörperfärbung konnte die stark verringerte Expression von ALCAM in den Morphanten belegt werden.

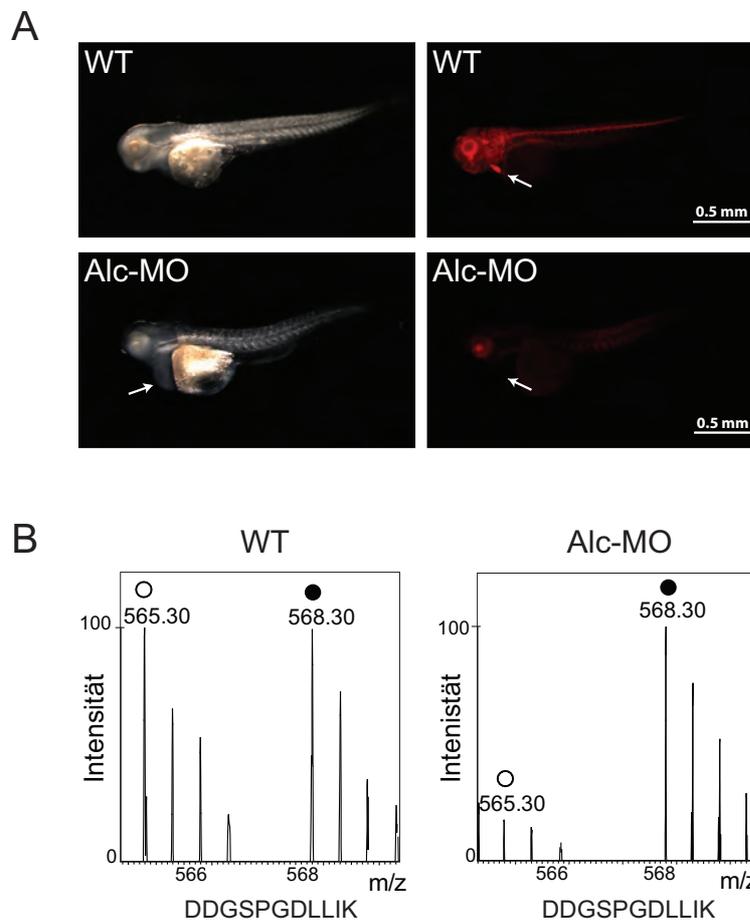


Abbildung 24.: Überprüfung des Morpholino-basierenden *knockdowns* von ALCAM. (A) *Whole-mount*-Antikörperfärbungen mit dem ALCAM-spezifischen Antikörper zn-8 bestätigt die reduzierte Expression im Herz, im Auge und in neuronalen Strukturen von ALCAM-Morphanten. (B) Exemplarische MS-Spektren eines ALCAM-Peptides im Wildtyp und im ALCAM-Morphanten.

Um den Effekt der verringerten ALCAM-Expression auf das Proteom zu untersuchen, wurde eine quantitative Proteomstudie basierend auf dem SILAC-Zebrafisch als internen Proteinstandard durchgeführt. Zum Zeitpunkt 72 hpf wurden jeweils 10 Embryonen von nicht-injizierten Fischen (WT), von Kontroll- und ALCAM-Morphanten (Kontroll- und Alc-MO) vereinigt und in SDT-Puffer homogenisiert. Für die Kontroll-Morphanten wurde ein Morpholino mit unspezifischer Sequenz injiziert, welcher für keine mRNA komplementär ist (Kapitel 2.10.5). Die Analyse dieser Kontroll-Morphanten ermöglicht eine Differenzierung zwischen unspezifischen Effekten der Morpholino-Injektion und dem spezifischen Einfluss des ALCAM-*knockdowns*. Als interner Standard für die quantitative Auswertung wurden vollständig markierte SILAC-Embryonen der F2-Generation zum Zeitpunkt 72 hpf vereinigt, in SDT-Puffer homogenisiert und basierend auf den Proteinkonzentrationen in einem Verhältnis von 1:1 mit den Proben der unmarkierten Embryonen (WT, Kontroll-MO und Alc-MO) gemischt. Die Proben wurden anschließend mittels der FASP-Methode enzymatisch mit Lys-C verdaut (Kapitel 2.13.8). Um die Komplexität der Proben zu verringern, erfolgte eine Auftrennung der Peptide mittels isoelektrischer Fokussierung in einem OFFgel *Fractionator* 3100 (Kapitel 2.13.9), in welchem die Peptide entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (pI) fraktioniert wurden. Im elektrischen Feld wandern die Peptide durch den pH-Gradientengelstreifen in das jeweilige Kompartiment, dessen pH-Wert dem isoelektrischen Punkt des Peptides entspricht. Anschließend wurden die wässrigen Fraktionen entnommen und die darin enthaltenen Peptide zum Entsalzen und Waschen auf C18-StageTips geladen. Nach der MS-Analyse wurden die Rohdaten mit Hilfe der MaxQuant software ausgewertet (Kapitel 2.14.3).

Mit Hilfe der quantitativen massenspektrometrischen Analyse konnte ALCAM anhand von 5 Peptiden, die einzig spezifisch für ALCAM sind, detektiert und quantifiziert werden. In Abbildung 24B sind die MS-Spektren eines Peptids von ALCAM aus der Probe des Wildtyps und des ALCAM-Morphanten zu sehen. Zwischen dem Wildtyp und dem internen Standard liegt ein 1:1-Verhältnis vor. Das zeigt, dass ALCAM in SILAC-Embryonen und in Wildtyp-Embryonen in vergleichbaren Mengen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu liegt in ALCAM-Morphanten das Verhältnis bei 5,2 (H/L - Ratio). Die Expression des Proteins ist daher in ALCAM-Morphanten im Vergleich zu nicht-injizierten Embryonen um das Fünffache reduziert. Der Morpholino-basierende *knockdown* von ALCAM war daher erfolgreich.

In der Abbildung 25 sind die Ergebnisse der quantitativen Proteomstudie des ALCAM-*knockdowns* dargestellt. Aus der Probe der Wildtyp-Embryonen konnten 2831 Proteine

quantifiziert werden, aus den Proben der Kontroll- und ALCAM-Morphanten jeweils 2766 Proteine (Abbildung 25A). Die \log_2 SILAC-Ratios der drei Experimente sind gegen die Peak-Intensitäten in den jeweiligen Streudiagrammen abgebildet. Wie im Kapitel 3.3 bereits beschrieben wurde, reflektiert das Farbschema der Datenpunkte den jeweiligen intensitätsabhängigen Signifikanzwert (*significance B*), welcher angibt, ob SILAC-Ratios außerhalb der Normalverteilung liegen. Proteine mit vergleichbaren SILAC-Ratios zwischen den SILAC-markierten und unmarkierten Embryonen besitzen einen Signifikanzwert über 0,05 und wurden als schwarze Datenpunkte dargestellt. Insgesamt lagen 84% (SILAC-Std/WT) bzw. 85% (SILAC-Std/Kontroll-MO; SILAC-Std/Alc-MO) der Proteine innerhalb der Normalverteilung. Hingegen werden Proteine mit einer signifikant unterschiedlichen Expression zwischen SILAC-markierten und unmarkierten Embryonen durch farbige Datenpunkte dargestellt (*significance B* < 0,05), welche einen Signifikanzwert zwischen 0,01 und 0,05 (grün), zwischen 0,001 und 0,01 (gelb) und unter 0,001 (rot) symbolisieren.

Um die Proteinexpression zwischen den unmarkierten Proben zu studieren, wurden erneut direkte Ratios aus SILAC-Ratios berechnet. Dafür wurden Proteine verwendet, für die SILAC-Ratios in beiden Proben detektiert wurden.

$$H/L (WT) \div H/L (Kontroll-MO) = Kontroll-MO/WT$$

$$H/L (WT) \div H/L (Alc-MO) = Alc-MO/WT$$

Die berechneten direkten Ratios wurden in der Abbildung 25B und C in Streudiagrammen gegen die summierte Peak-Intensität aufgetragen. Als Hinweis auf die Verteilung wurden die Datenpunkte leicht transparent dargestellt, was bei einer starken Gruppierung zur verstärkten Schwärzung führt. Dieser Effekt ist bei beiden Streudiagrammen um den Wert null zu beobachten und spiegelt eine Normalverteilung der Datenpunkte wider. Zwischen den Proben der Kontroll-Morphanten und Wildtypen konnten 2339 Proteine quantifiziert werden (Abbildung 25B). Die absolute Mehrheit der Proteine (98,7%), die als schwarze Datenpunkte dargestellt sind, zeigt keine Regulation zwischen den beiden Proben. Darunter befindet sich auch ALCAM, welches durch den unspezifischen Morpholino nicht beeinflusst wird und daher die gleiche Expression in den Wildtypen und den Kontroll-Morphanten zeigt. Nur 31 Proteine (\cong 1,3%) sind mindestens zweifach zwischen beiden Proben reguliert. Die Pearson-Korrelation zwischen den detektierten SILAC-Ratios beider

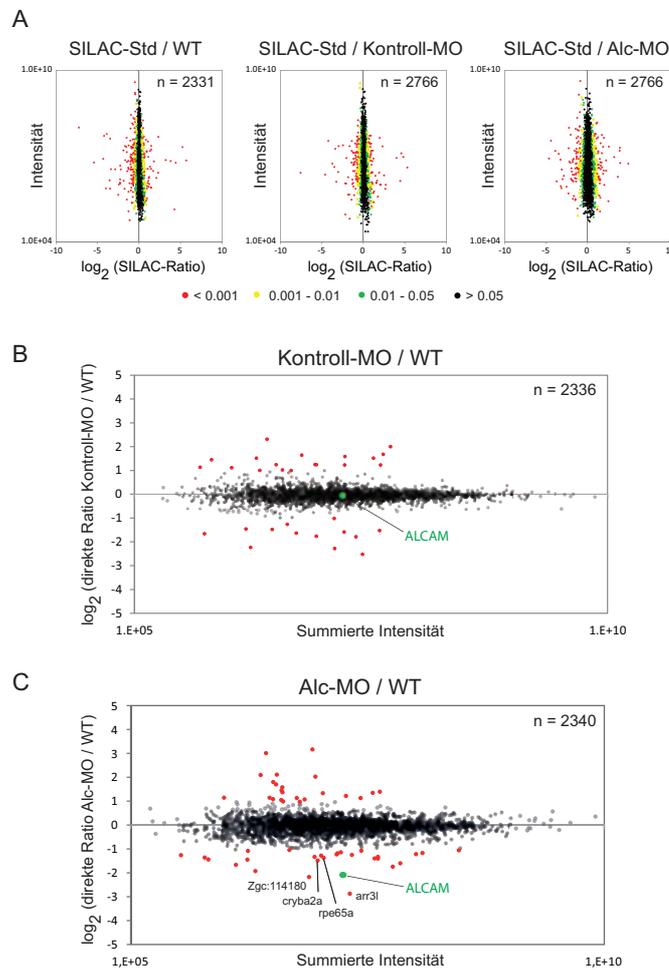


Abbildung 25.: Ergebnisse der SILAC-Studie von ALCAM-Morphanten. (A) Die Streudiagramme enthalten die SILAC-Ratios (\log_2) zwischen SILAC-Standard und unmarkierten Wildtypen (WT), unmarkierten Kontroll-Morphanten (Kontroll-MO) und unmarkierten ALCAM-Morphanten (Alc-MO). Signifikanzwerte (*significance* B) sind farbig markiert. (B) Die Verteilung der direkten Ratios zwischen Wildtypen und Kontroll-Morphanten ($n = 2339$) ist im Streudiagramm dargestellt. 31 Proteine ($\hat{=}$ 1,3%) sind zwischen den Proben mindestens zweifach reguliert (rote Datenpunkte). Die Werte sind im Anhang in Tabelle 2 aufgelistet. (C) Das Streudiagramm enthält die Verteilung der direkten Ratios zwischen Wildtypen und ALCAM-Morphanten ($n = 2340$). 46 Proteine ($\hat{=}$ 2%) sind zwischen den Proben mindestens zweifach reguliert (rote Datenpunkte). ALCAM (grüner Datenpunkt) und Augen-spezifische Proteine wurden beschriftet. Die Werte sind im Anhang in Tabelle 3 aufgelistet.

Proben beträgt 0,8. Zum Vergleich, die Korrelationen zwischen biologischen Triplikaten belief sich auf 0,79 - 0,85 (Kapitel 3.2.5). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Injektion des unspezifischen Morpholinos so gut wie keinen Einfluss nimmt, da die Unterschiede zwischen nicht-injizierten und Kontroll-MO-injizierten Embryonen im Bereich der Differenz zwischen biologischen Individuen liegen.

Für den anschließenden Vergleich zwischen Wildtypen und ALCAM-Morphanten wurden Proteine, die in den Kontroll-Morphanten eine Regulation zeigten, nicht in der folgenden Auswertung berücksichtigt, um den spezifischen Einfluss des ALCAM-*knockdowns* von den unspezifischen Effekten der Morpholino-Injektion zu differenzieren. Dabei handelt es sich um 7 diverse Proteine, die sowohl in den Kontroll- als auch in den ALCAM-Morphanten im Vergleich zu den Wildtypen mehr als zweifach reguliert vorlagen. Als unspezifisch regulierte Proteine konnten u.a. das *Akap1b protein*, das Dottersackprotein *Vtg3 protein* und das am Vesikeltransport beteiligte Protein *Coatomer protein complex, subunit zeta 1* detektiert werden.

Das Streudiagramm in Abbildung 25C enthält 2340 Proteine, die in der Probe der Wildtypen sowie in den ALCAM-Morphanten quantifiziert wurden. Die Pearson-Korrelation zwischen den SILAC-Ratios beider Proben beträgt 0,7. Die absolute Mehrheit der Proteine (98%) ist zwischen ALCAM-Morphanten und Wildtypen nicht reguliert. Diese Proteine sind als schwarze Datenpunkte dargestellt. Eine ähnlich geringe Differenz zu den Wildtypen konnte auch für die Kontroll-Morphanten gezeigt werden. Der Anteil der Proteine, die mindestens zweifach reguliert sind, beläuft sich auf 2% (rote Datenpunkte). 27 (\cong 1,2%) von diesen Proteinen sind in den ALCAM-Morphanten im Vergleich zu den Wildtypen herunterreguliert. Neben der Regulation von ALCAM (grüner Datenpunkt) konnten spezifische Proteine der Retina als herunterreguliert identifiziert werden. Proteine der retinalen Ganglienzellen wie *Arrestin 3* (*arr3l*), das *Retinal pigment epithelium-specific protein 65a* (*rpe65a*) und *Recoverin* (*Zgc:114180*) sowie das Linsenprotein *Crystallin, beta A2a* (*cryba2a*) sind in ALCAM-Morphanten herunterreguliert. Die reduzierte Expression von Augen-spezifischen Proteinen resultiert höchstwahrscheinlich aus der geringeren Augengröße der ALCAM-Morphanten im Vergleich zu den Wildtypen und weist weiterhin auf eine unvollständige Differenzierung der retinalen Ganglienzellen hin (Diekmann und Stuermer, 2009). Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit Hilfe der quantitative Proteomstudie nur geringe Effekte basierend auf dem ALCAM-*knockdown* detektiert werden konnten, wobei

diese hauptsächlich den Augen-Phänotyp beschreiben. Aussagen über den Herz-Phänotyp konnten nicht getroffen werden. Wahrscheinlich konnte auf Grund der geringen Größe des Herzens im Verhältnis zum gesamten Embryo eine eventuell veränderte Proteinexpression im Herzen massenspektrometrisch nicht erfasst werden. Des Weiteren könnte eine herzspezifische Proteinexpression vom Proteom des Skelettmuskulatur überlagert werden.

3.4.2. Die Genexpressionsanalyse von ALCAM-Morphanten bestätigt die verzögerte Augenmorphogenese

Um die Effekte des ALCAM-*knockdowns* auf Transkriptebene zu studieren, wurde eine Genexpressionsanalyse mit Hilfe von Affymetrix-Microarrays (*GeneChip Zebrafish Genome Array*) durchgeführt. Jeweils 3 Embryonen von nicht-injizierten Fischen und von ALCAM-Morphanten in einem Alter von 72 hpf wurden für die RNA-Isolierung vereinigt (Kapitel 2.12.1). Für beide Proben wurden 3 parallele Ansätze als biologische Triplikate ($n = 3$) bearbeitet. Die Durchführung der Microarrays sowie die Datenanalyse sind in Kapitel 2.12.2 beschrieben.

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zwischen Wildtypen und ALCAM-Morphanten. Mit Hilfe von RefSeq-IDs konnten 8585 Gene basierend auf aktuellen Gen-Annotationen identifiziert und das Expressionsverhältnis der einzelnen Gene zwischen Wildtypen und ALCAM-Morphanten berechnet werden. Da beide Ansätze als Triplikate bearbeitet wurden, erfolgte eine statistische Auswertung zur Bestimmung der Signifikanzwerte (p-Wert) anhand eines T-Tests mit Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiples Testen. Die Expressionsverhältnisse aller Gene wurden in der Abbildung 26A in einem sog. *Vulcano plot* gegen die negativ logarithmierten Signifikanzwerte ($-\log_{10}$ p-Wert, Y-Achse) aufgetragen. Die Verteilung der Datenpunkte erscheint als Vulkanform, da die Daten mit steigender Signifikanz (steigender $-\log_{10}$ p-Wert) eine breitere Streuung der Expressionsverhältnisse zwischen Wildtypen und ALCAM-Morphanten aufzeigen. Die Datenpunkte sind leicht transparent dargestellt, um deren Verteilung durch einen Dichtegradienten anzudeuten. Die Mehrheit der Gene liegt gruppiert um den Wert null, was einer Normalverteilung der Daten entspricht. Der verwendete Morpholino bindet spezifisch an die mRNA von ALCAM, um die Translation zu blockieren. Eine Veränderung der ALCAM-Expression (grüner Datenpunkt) wurde daher nicht detektiert. Von den 8585

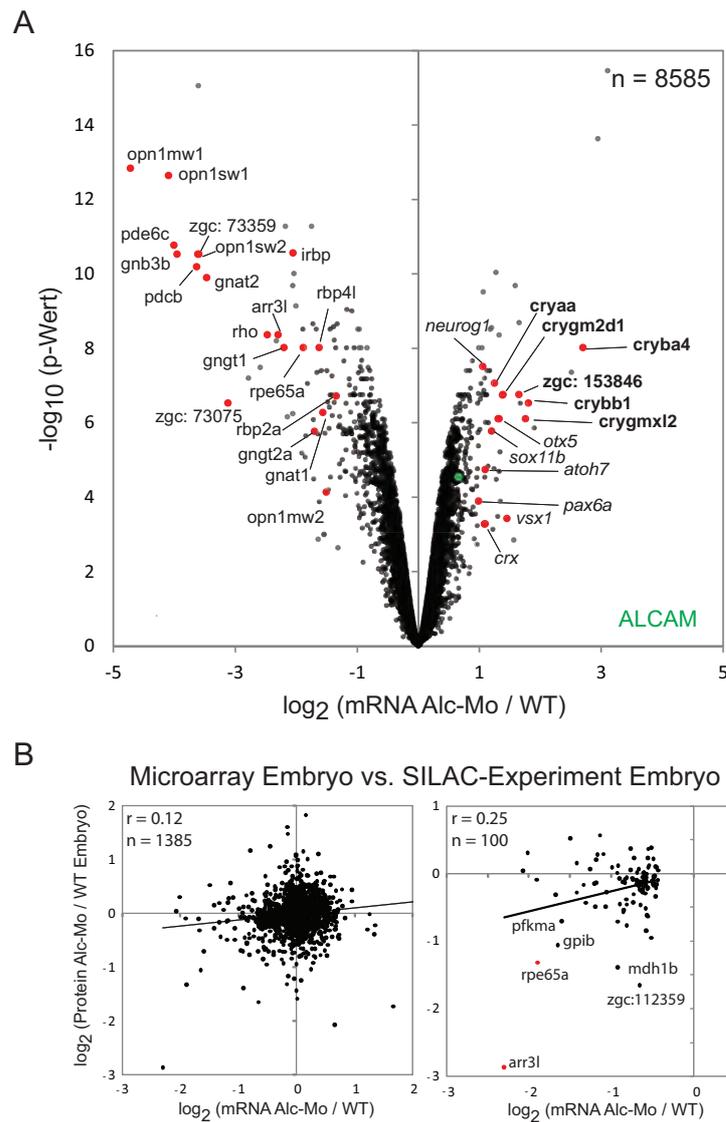


Abbildung 26.: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von ALCAM-Morphanten. (A) Unterschiede im Transkriptom zwischen Wildtype-Embryonen ($n = 3$) und ALCAM-Morphanten ($n = 3$) wurden mit Hilfe des Affymetrix-Microarrays analysiert. Die Expressionsverhältnisse (X-Achse) von 8585 Genen wurden gegen die negativ logarithmierten Signifikanzwerte ($-\log_{10}$ p-Wert, Y-Achse) aufgetragen. Rote Datenpunkte zeigen eine signifikante Regulation (mind. zweifach, $p < 0,05$). Die Werte sind im Anhang in Tabelle 4 aufgelistet. (B) Vergleich der Transkriptom- und Proteomstudie. Die Pearson-Korrelation liegt bei 0,12. Werden nur herunterregulierte Kandidaten betrachtet, steigt die Korrelation auf 0,25.

Genen zeigten nur 1,7% (146 Gene) eine Regulation von mindestens zweifach mit einer Signifikanz von $p < 0,05$. Von dieser Gruppe sind 102 Gene in den ALCAM-Morphanten signifikant herunterreguliert (mind. zweifach), wobei Gene der Netzhaut ebenfalls die größte Regulation zeigen (rote Datenpunkte in Abbildung 26). Dabei handelt es sich um Gene, die für Photorezeptoren (*opsin 1 medium-wave-sensitive 1* (*opn1mw1*), *opsin 1 short-wave-sensitive 1* (*opn1sw1*), *rhodopsin* (*rho*)) oder für Proteine der Phototransduktion (*guanine nucleotide binding protein (G protein)* (*gnat3b*, *gnat2*, *gngt1*, *gngt2a*), *arrestin 3a* (*arr3l*), *Retinal cGMP phosphodiesterase* (*zgc:73359*)) kodieren. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit der quantitativen Proteomstudie (Kapitel 3.4.1) erzielt werden, welche eine geringere Expression von verschiedenen Netzhautproteinen in ALCAM-Morphanten zeigte.

In der Gruppe der hochregulierten Gene (mind. zweifach, $p < 0,05$) konnten neuronale Transkriptionsfaktoren wie *neurogenin 1* (*neurog1*), *atonal homolog 7* (*atoh7*) und *orthodenticle homolog 5* (*otx5*) identifiziert werden, die in Abbildung 26A als rote Datenpunkte mit kursiver Schrift markiert wurden. Weiterhin konnten Transkriptionsfaktoren der Augen- bzw. der Netzhautentwicklung (*cone-rod homeobox* (*crx*), *visual system homeobox 1 homolog* (*vsx1*)) mit einer mind. zweifachen Regulation detektiert werden. Des Weiteren konnten viele Kristalline der Linse als signifikant hochreguliert identifiziert werden (u.a. *crystallin beta A4*, *crystallin beta B1*). Sie sind in der Abbildung als rote Datenpunkte mit Blockschrift markiert. Die Anreicherung von Transkriptionsfaktoren der Augen- und Netzhautentwicklung weist höchstwahrscheinlich auf eine verzögerte Augenmorphogenese in den ALCAM-Morphanten hin. Auch die gesteigerte Expression von Kristallinen lässt auf eine Entwicklung schließen, die in den Augen der Wildtypen bereits abgeschlossen ist.

Im nächsten Schritt erfolgte ein Vergleich der Transkriptom- und Proteomdaten. Abbildung 26B (links) zeigt die Gegenüberstellung beider Datensätze im Streudiagramm. Für 1385 Proteine (aus Kapitel 3.4.1) konnte das entsprechende Gen im Microarray detektiert werden. Die Pearson-Korrelation zwischen beiden Datensätzen liegt nur bei 0,12. Werden nur die herunterregulierten Kandidaten verglichen, steigt die Korrelation auf 0,25 an. Lediglich einige wenige Kandidaten wie die Netzhautproteine *arrestin 3a* (*arr3l*) und das *retinal pigment epithelium-specific protein 65a* (*rpe65a*) konnten als regulierte Transkripte und Proteine identifiziert werden. Obwohl der Augenphänotyp auf beiden Ebenen darstellbar war, konnte nur eine kleine gemeinsame Schnittmenge zwischen beiden Datensätzen

detektiert werden. Weiterhin konnte der Herz-Phänotyp auch mit Hilfe der Genexpressionsanalyse nicht charakterisiert werden.

3.4.3. ALCAM beeinflusst die Zelladhäsion und die Organisation des Cytoskeletts im Herzen

Für die beschriebenen Proteom- und Transkriptomanalysen (Kapitel 3.4.1 und 3.4.2) wurden vollständige Embryonen verwendet. Da der ausgeprägte Herz-Phänotyp in beiden Studien nicht nachvollziehbar war, scheint die Gewebe-spezifische Expression der Proteine durch das Gesamt-Proteom überlagert zu werden. Um die herzspezifischen Effekte der ALCAM-Morphanten zu dokumentieren, wurden beide Studien mit isolierten Herzen wiederholt.

Der ALCAM-Morpholino wurde mehrmals in etwa 300 - 400 Oozyten der Linie *Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)*^{s883} injiziert, um für die Herzisolierung eine ausreichende Anzahl an positiven Morphanten zu erhalten. Etwa 100 Herzen aus ALCAM-Morphanten sowie aus nicht-injizierten Embryonen zum Zeitpunkt 72 hpf wurden vereinigt und in SDT-Puffer homogenisiert. Eine Proteinmenge von jeweils etwa 5 μg konnte auf diesem Wege angereichert werden. Die Proteinprobe der Wildtypen und der ALCAM-Morphanten wurden anschließend mit dem SILAC-Standard aus Embryonen der F2-Generation (72 hpf) in einem Verhältnis 1:1 gemischt, in Lösung enzymatisch mit Lys-C fragmentiert (Kapitel 2.13.6) und massenspektrometrisch analysiert (LC-MS/MS). Die Morpholino-Injektion, Herzisolierung und Probenbearbeitung wurden für die Auswertung biologischer Duplikate wiederholt. Die Datenauswertung erfolgt mit MaxQuant (Kapitel 2.14.3).

Die Ergebnisse der gemessenen Duplikate wurden jeweils für die Wildtyp-Proben und die Proben der ALCAM-Morphanten gemittelt, um direkte Ratios zu berechnen.

$$H/L (WT Herz) \div H/L (Alc-MO Herz) = Alc-MO Herz / WT Herz$$

Insgesamt konnten 925 Proteine aus den Herzen beider Proben quantifiziert werden. 15,5% (143) der Proteine zeigten eine mindestens zweifache Regulation zwischen Herzen der Wildtypen und ALCAM-Morphanten. Im Vergleich, die Proteomstudie basierend auf gesamten Embryonen ergab nur einen Anteil von 2% regulierter Proteine (Kapitel 3.4.1). Um die

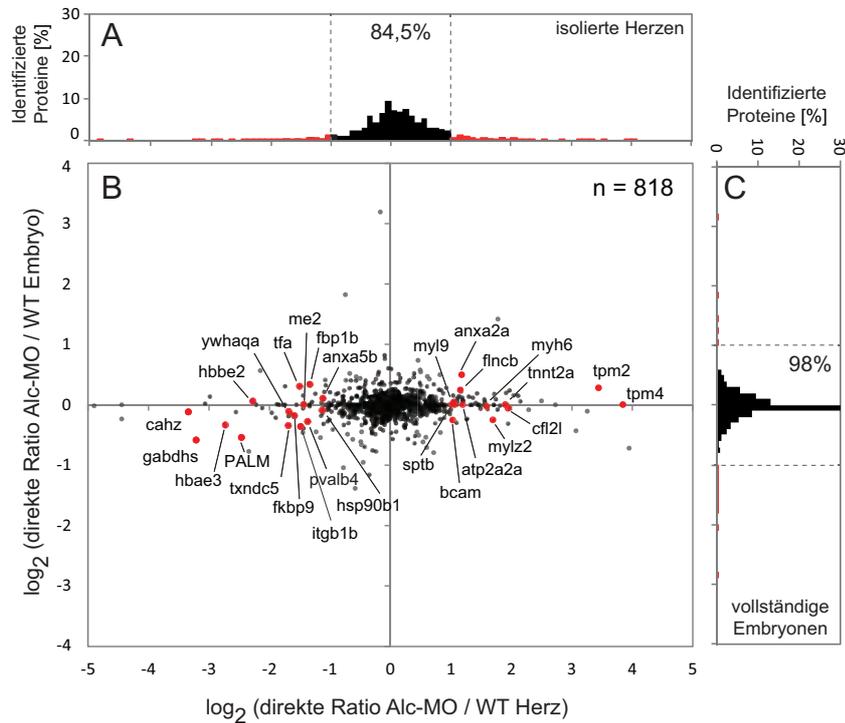


Abbildung 27.: Der Vergleich beider SILAC-Studien von ALCAM-Morphanten als Gesamt-Embryonen und Herz-Isolaten. Das Streudiagramm enthält die Ratios (\log_2) zwischen Wildtypen (WT) und ALCAM-Morphanten (Alc-MO) der Gesamt-Embryonen (Y-Achse) (mit Balkendiagramm rechts) und der Herzzisolierung (X-Achse) (mit Balkendiagramm oben). Schwarze Balken symbolisieren Proteine ohne Regulation zwischen WT und Alc-MO. Proteine mit einer Regulation von mind. zweifach sind als rote Balken dargestellt. Im Streudiagramm sind Beispielkandidaten mit einer Regulation von mind. zweifach im Herzdatensatz, aber ohne Regulation im Datensatz der Gesamt-Embryonen als rote Punkte gekennzeichnet. Die Werte sind im Anhang in Tabelle 5 aufgelistet.

Genauigkeit der vorliegenden Studie zu überprüfen, wurde die Korrelation zwischen den beiden Wildtyp-Proben bestimmt. Mit einer Pearson-Korrelation von 0,77 konnte für die Proteomstudie isolierter Herzen die Reproduzierbarkeit von biologischen Replikaten entsprechend Kapitel 3.2.5 bestätigt werden (Anhang A Abbildung 39).

Um die herzspezifische Proteomstudie der ALCAM-Morphanten mit der Studie gesamter Embryonen zu vergleichen, wurden die Datensätze in Abbildung 27B in einem Streudiagramm einander gegenübergestellt. Die Proteindaten der vollständigen Embryonen liegen auf der Y-Achse, die Daten der Herzanalyse auf der X-Achse. Das Diagramm enthält 818

Proteine, die in beiden Studien detektiert wurden. Die Daten aus der Embryostudie liegen stark gruppiert um den Wert null. Auch im zugehörigen Histogramm (Abbildung 27C) ist diese Verteilung zu erkennen. Die Mehrheit der Proteine (98%), die durch schwarze Balken repräsentiert wird, wies keine Regulation zwischen Wildtypen und ALCAM-Morphanten auf. Im Gegensatz dazu zeigt die Herzstudie eine große Streuung der Datenpunkte. 15,5% der quantifizierten Proteine sind mehr als zweifach reguliert und wurden als rote Balken im oberen Histogramm dargestellt (Abbildung 27A). Nicht-regulierte Proteine belaufen sich nur auf 84,5%, welche durch die flachen schwarzen Balken symbolisiert werden. Auf Grund der Gegenüberstellung beider Studien im Streudiagramm konnten Proteine identifiziert werden, die in den Herzen der ALCAM-Morphanten eine veränderte Expression aufweisen, aber im Gesamt-Proteom des Embryos ohne Regulation quantifiziert wurden (exemplarische Kandidaten in rot markiert). 70 Proteine wurden im Herzen ($\cong 7,6\%$) als herunterreguliert detektiert. Dabei handelt es sich z.B. um *Paralemmalin* (PALM), *Integrin beta* (itgb1b), *Carbonic anhydrase* (cahz) und das *Gapdhs protein* (gapdhs). Des Weiteren konnten regulierte Proteine im Datensatz der isolierten Herzen detektiert werden, die im Datensatz der gesamten Embryonen nicht identifiziert wurden, wie z.B. *Cardiac myosin light chain-1* und das *Ras-like protein Rac1a*. Weiterhin konnten auch Proteine mit einer herzspezifische Expression identifiziert werden, die im Gegensatz zum Wildtyp hochreguliert sind. Bei diesen 73 Proteine ($\cong 7,9\%$) sind Strukturproteine der Muskulatur und des Cytoskeletts wie *Tropomyosin 4* und *2* (tpm4, tpm2), *Muscle cofilin 2* (cfl2l) und das *Cardiac troponin T* (tnnt2a) stark vertreten.

Um die Veränderungen der Herzen in den ALCAM-Morphanten auch auf Transkriptebene zu untersuchen, wurde erneut eine Genexpressionsanalyse mit Hilfe von Affymetrix-Microarrays durchgeführt. Um aus isolierten Herzen eine ausreichende RNA-Menge von 250 ng zu erhalten, wurden mehrmals etwa 300 - 400 Oozyten der Linie *Tg(myf7:EGFP-HsHRAS)*^{s883} mit dem ALCAM-Morpholino injiziert. Aus den resultierenden Morphanten zum Zeitpunkt 72 hpf wurden die Herzen isoliert, vereinigt und für die RNA-Isolierung verwendet. Parallel dazu wurden die Herzen von nicht-injizierten Embryonen (72 hpf) isoliert und aufgearbeitet. Die Durchführung der Microarrays sowie die Datenanalyse sind in Kapitel 2.12.2 beschrieben. Auf Grund der geringen Probenmenge konnten keine experimentellen Replikate und daher keine statistische Auswertung zur Bestimmung der Signifikanzwerte (p-Wert) erfolgen.

Basierend auf dem Microarray konnten die Expressionsverhältnisse von 8585 Genen zwischen Herzen von Wildtypen und ALCAM-Morphanten detektiert werden. Nur 2,4% (202) der Gene zeigten im Morphanten eine Regulation von mind. zweifach. Um die Transkriptdaten mit den Proteomdaten zu vergleichen, wurden beide Datensätze in einem Streudiagramm gegenübergestellt (Abbildung 28). Für 655 Proteine aus dem Herzdatensatz konnte das entsprechende Gen im Microarray detektiert werden. Die Pearson-Korrelation zwischen beiden Studien beträgt nur 0,09. Dennoch konnten für einige regulierte Proteine auch eine entsprechende Regulation auf Transkriptebene nachgewiesen werden. In Abbildung 28 sind diese Kandidaten rot markiert. Wie im Proteomdatensatz sind z.B. die *Carbonic anhydrase* (*cahz*), das *Gapdhs protein* (*gapdhs*) und *Paralemmin* (PALM) auch in der Genexpressionsstudie herunterreguliert, wobei die Regulation auf Transkriptebene weniger stark ausgeprägt ist. In der Gruppe der hochregulierten Kandidaten konnten strukturelle Proteine der Muskulatur und des Cytoskeletts wie das *Cardiac troponin T* (*tnnt2a*), verschiedene Myosine (*mylz2*, *myl10*) und *Annexin A2a* (*anxa2a*) auch im Microarray detektiert werden.

Der Phänotyp der ALCAM-Morphanten zeichnet sich durch eine fehlerhafte Herz-Morphogenese aus, die durch deformierte Kammern (Ventrikel und Atrium) sowie einem unvollständigen *Looping*-Prozess charakterisiert wird. Mit Hilfe der quantitativen Proteomstudie sowie der Genexpressionsanalyse konnte dieser herzspezifische Phänotyp untersucht werden. Durch die Isolierung von Herzen konnten gewebespezifische Kandidaten identifiziert werden, die durch die Inaktivierung von ALCAM eine Veränderung aufweisen. Es konnte eine erhöhte Expression von Strukturproteinen im Herzmuskel detektiert werden. Sowohl auf Protein- als auch auf Transkriptebene zeigten Kandidaten wie Tropomyosine und Troponine in den Herzen der Morphanten eine erhöhte Regulation. Als herunterregulierte Kandidaten konnten Proteine der Zelladhäsion und der Organisation des Cytoskeletts (*Paralemmin*, *Ras-like protein Rac1a*, *Integrin beta*) in den ALCAM-Morphanten detektiert werden.

3.4.4. Die Validierung von ALCAM-regulierten Kandidaten mittels *Whole-mount*-Antikörperfärbung

Um die veränderte Expression von Kandidaten in ALCAM-Morphanten mit Hilfe einer weiteren Methode zu überprüfen, wurden *Whole-mount*-Antikörperfärbungen durchgeführt.

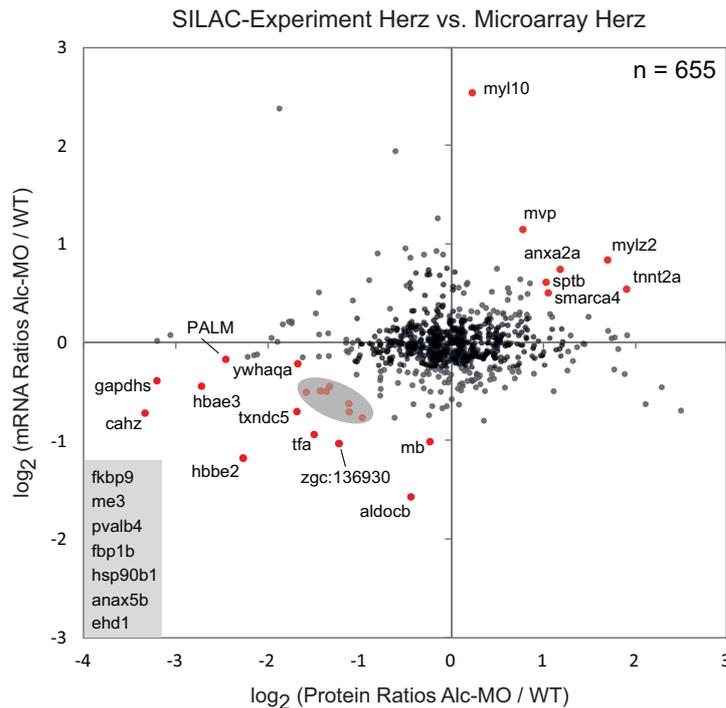


Abbildung 28.: Gegenüberstellung der herzspezifischen Transkriptom- und Proteomstudie. Die Expression von 655 Proteine (\log_2 Ratio) zwischen Herzen der Wildtypen (WT) und ALCAM-Morphanten (X-Achse) wurden gegen die Expression (\log_2) des entsprechenden Gens (Y-Achse) aufgetragen. Kandidaten in rot zeigen eine mind. zweifache Regulation entweder auf Protein- oder Transkriptebene. Die Werte sind im Anhang in Tabelle 6 aufgelistet.

Auf Grund der sehr geringen Anzahl von spezifischen Antikörpern für den Modelorganismus Zebrafisch wurden verschiedene Maus- und Kaninchen-spezifische Antikörper getestet und verwendet. In Hinblick auf die Anzahl regulierter Kandidaten in den Herzen von ALCAM-Morphanten konnten nur die hier vorliegenden Färbungen als spezifisch angesehen werden. Die Verwendung weiterer Antikörper für die Validierung von Kandidaten wie z.B. Rac1 (BD Bioscience) oder Integrin beta1 (erhalten von Herrn Markus Moser, MPI für Biochemie, Martinsried) blieb ohne Erfolg, da die detektierten Signale nicht spezifisch waren.

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der *Whole-mount*-Antikörperfärbung dargestellt. Alle Färbungen wurden entsprechend dem Protokoll aus Kapitel 2.15.2 mit einem Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper durchgeführt. Um die Fluoreszenzsignale zwischen den nicht-injizierten Embryonen (Wildtyp, WT) und den ALCAM-Morphanten (Alc-MO)

vergleichen zu können, erfolgte die Bildaufnahme mit der gleichen Belichtungsdauer. Jede Färbung wurde mind. zweimal mit jeweils 10 Embryonen durchgeführt. Um die Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper auf unspezifische Signale zu überprüfen, erfolgten Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper. Die Kontrollen der beiden Sekundärantikörper zeigten keine detektierbaren Signale im verwendeten Belichtungsbereich (Färbungen nicht gezeigt).

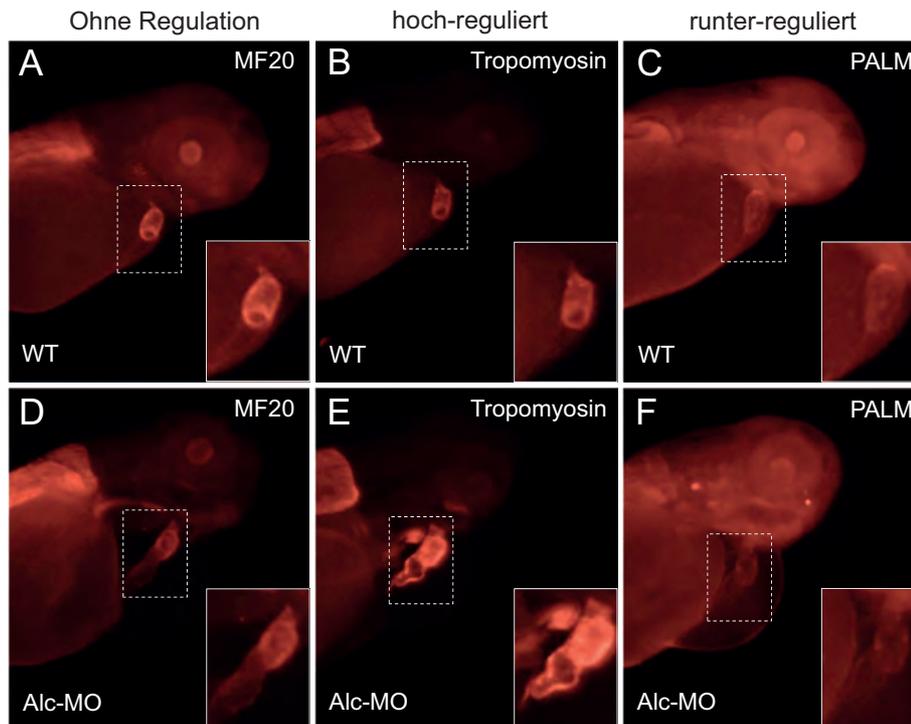


Abbildung 29.: Whole-mount-Antikörperfärbungen zur Validierung regulierter Kandidaten in ALCAM-Morphanten. Die einzelnen Bilder zeigen nicht-injizierte Embryonen (WT) (A-C) und ALCAM-Morphanten (Alc-MO) (D-F) zum Zeitpunkt 72 hpf. Die Embryonen wurden seitlich dargestellt, anterior zur rechten Bildseite, dorsal nach oben. Die Vergrößerung des Herzens ist in der rechten unteren Bildecke zu sehen. (A, D) Kontrollfärbungen wurden mit dem Antikörper MF20 gegen sarkomeres Myosin durchgeführt. (B, E) Eine herzspezifische stärkere Expression von Tropomyosin wurde durch *CH1* belegt. (C, F) Die geringere Expression von Paralemmin (PALM) im Herzen der ALCAM-Morphanten wurde einen Paralemmin-spezifischen Antikörper bestätigt.

Für die Färbung eines Proteins ohne Regulation wurde der Antikörper MF20 verwendet, der spezifisch die schwere Kette von sarkomerem Myosin bindet. In Abbildung 29A und D sind die MF20-Färbungen der Wildtypen und der ALCAM-Morphanten dargestellt. In beiden Bildern ist die Färbung der Skelettmuskulatur und des Herzens zu erkennen. Die Umrandung der Herzen markiert den Bereich, der vergrößert in der rechten unteren Ecke

dargestellt ist. Aus beiden Bildern ist zu entnehmen, dass die Färbung des Ventrikels deutlich stärker ausfällt als im Atrium. Durch die laterale Sicht auf das Herz ist im Wildtyp die partielle Überlagerung von Ventrikel und Atrium zu erkennen, welche durch den *Looping*-Prozess entsteht. Im Gegensatz dazu ist das *Looping* im ALCAM-Morphanten unvollständig, da beide Kammern linear hintereinander liegen (Abbildung 29D). Die Färbung des Herzens zwischen Wildtypen und ALCAM-Morphanten ist vergleichbar, wobei die leicht schwächeren Signale im Ventrikel der Morphanten durch die langgestreckte Herz-Morphologie zu erklären ist.

Um die stärkere Expression von Tropomyosinen im Herzen der Morphanten zu prüfen, wurden Färbungen mit dem Antikörper CH1 durchgeführt, welcher an das herzspezifische α -Tropomyosin sowie die α - und β -Tropomyosine des Skelettmuskels bindet. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 29B und E dargestellt. Zu erkennen sind die spezifischen Färbungen der Skelettmuskulatur und des Herzens, wobei erneut die Signale im Ventrikel stärker als im Atrium sind. Im Vergleich zum Wildtyp fällt die Antikörperfärbung im Herzen der ALCAM-Morphanten sehr viel stärker aus. Die Expression der Tropomyosine liegt im Morphanten somit deutlich über dem Niveau der Wildtypen. Dies ist vergleichbar mit den quantifizierten Proteindaten, bei denen eine Regulation von Tropomyosin 4 und 2 im Herzen von 3,9 bzw. 3,4 (\log_2) dokumentiert wurde (Abbildung 27). Im Gegensatz dazu konnte für Tropomyosin 4 auf Transkriptebene keine Regulation beschrieben werden und Tropomyosin 2 konnte mittels Microarray nicht detektiert werden.

Mit den letzten beiden Färbungen konnte die geringere Expression von Paralemmin (PALM) in den Herzen der Morphanten belegt werden (Abbildung 29C und F). Paralemmin wird im Herzen und vor allem in neuronalen Strukturen exprimiert. Daher sind weite Bereiche der Embryonen angefärbt. Im Vergleich zum Wildtyp liegt im ALCAM-Morphanten eine schwächere Färbung des Herzens vor. Durch die geringere Expression von Paralemmin sind im Ventrikel nur sehr schwache Signale zu erkennen. Diese Ergebnisse bestätigen ebenfalls die quantifizierten Proteindaten, bei denen eine Regulation im Herzen von -2,5 (\log_2) beschrieben wurde (Abbildung 27). Auf mRNA-Ebene konnte dagegen keine Regulation detektiert werden.

Mit Hilfe der *Whole-mount*-Antikörperfärbungen konnten somit die Ergebnisse der quantitativen Proteomstudie basierend auf dem SILAC-Zebrafisch bestätigt werden, wodurch die Genauigkeit der globalen Analyse belegt wurde.

3.5. SILAC-Maus-basierende quantitative Alterungsstudie von Kardiomyozyten

Ein weiterer wichtiger Modellorganismus für humane Krankheitsmodelle ist die Maus (*Mus musculus*). Gerade im Bereich der Herz-Kreislaufkrankungen konnten im Mausmodell wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Neben den entwicklungsbiologischen Fragestellungen basierend auf dem Zebrafisch standen in der vorliegenden Arbeit auch die Analysen von altersbedingten Veränderungen der Herzfunktion im Vordergrund. Um diese altersbedingte Anpassungen im Proteom der Kardiomyozyten zu dokumentieren, wird die SILAC-Maus als interner Standard für die Proteinquantifizierung eingesetzt.

3.5.1. Die SILAC-Maus als interner Proteinstandard

Die Durchführung der Alterungsstudie ist in Abbildung 30 dargestellt. Um die Herzmuskelzellen der adulten Mäuse zu isolieren, wurden die Herzen entnommen und die Kardiomyozyten mittels einer Kollagenase-Perfusion aus dem Bindegewebe herausgelöst. Die Durchführung der Isolierung ist in Kapitel 2.11.1 beschrieben. Die isolierten Zellen der adulten Mäuse im Alter von 2, 22 und 30 Monaten sowie die Kardiomyozyten der SILAC-Maus in einem Alter von 2 Monaten wurden in SDT-Puffer mit Hilfe eines Glas-Douncers homogenisiert. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt, um die unmarkierten Proteinproben mit der Probe des schweren SILAC-Standards in einem Verhältnis von 1:1 zu mischen. Die Lysin-6-markierten SILAC-Kardiomyozyten wurden als Proteinstandard in die Proben der jungen Kardiomyozyten als auch mit den gealterten Zellen (22 und 30 Monate) gemischt, um die beiden Alterungsstadien mit dem frühen Zeitpunkt zu vergleichen.

3.5.2. Kardiomyozyten nach 22 Monaten weisen eine erhöhte Expression von Proteinen des Keton-Metabolismus auf

Die Proteinproben wurden mittels einer zellulären Fraktionierung (*ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit*) in Subproteome zerlegt und die einzelnen Fraktionen zusätzlich mittels SDS-PAGE aufgetrennt, um niedrig abundante Proteine massenspektro-

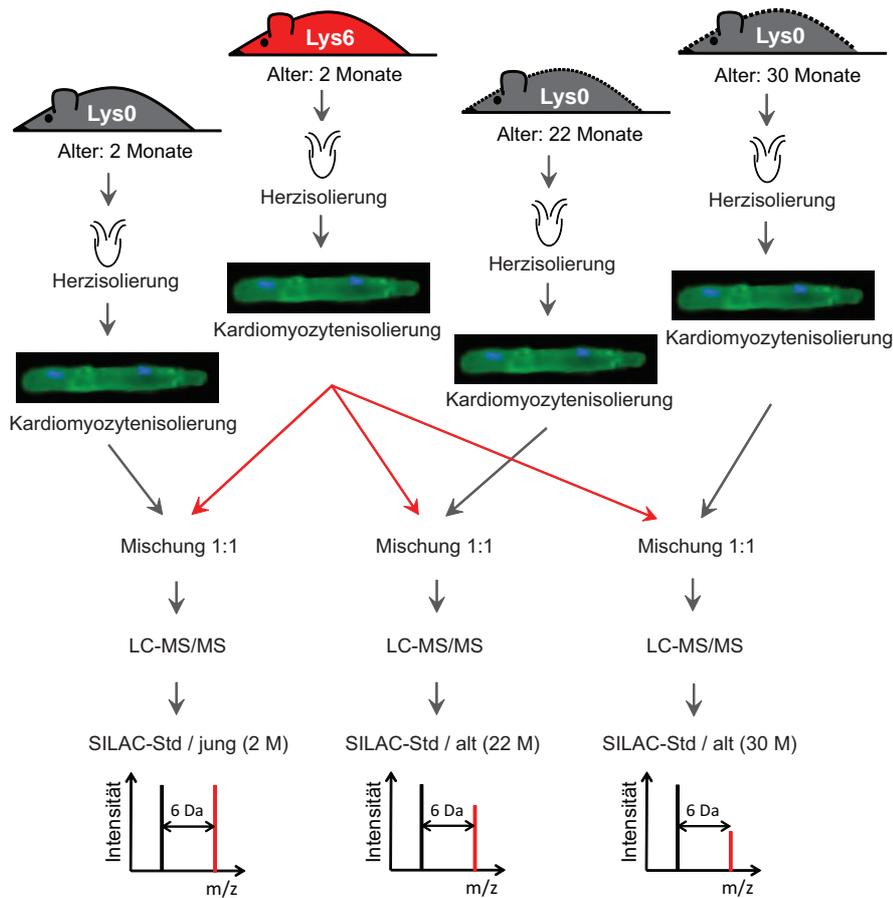


Abbildung 30.: Durchführung der quantitativen Alterungsstudie von Kardiomyozyten mit Hilfe der SILAC-Maus. Kardiomyozyten wurden aus unmarkierten Mäuse im Alter von 2, 22 und 30 Monaten sowie aus der SILAC-Maus im Alter von 2 Monaten isoliert. Die Zellen der SILAC-Maus dienen als interner Standard für die Proteinquantifizierung und wurden in die unmarkierten Proben der verschiedenen Zeitpunkte gemischt. Nach der massenspektrometrischen Analyse wurden an Hand der SILAC-Ratios beide Alterungszeitpunkte mit der jungen Probe verglichen, um altersspezifisch exprimierte Proteine zu detektieren.

metrisch detektieren zu können. Diese Aufarbeitung erfolgt mit Kardiomyozyten von zwei jungen (2 Monaten) und zwei alten (22 Monaten) Mäusen als biologische Duplikate sowie mit Zellen der SILAC-Maus (2 Monate). Mit Hilfe der subzelluläre Fraktionierung wurden die Zellen in eine cytosolische, in eine nukleäre und ein Membranfraktion zerlegt. Jede Fraktion wurde wiederum mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die einzelnen Gelspuren in 15 Bereiche untergliedert und im Gel enzymatisch mit Lys-C verdaut. Nach der massenspek-

trometrischen Analyse wurden die Rohdaten der einzelnen Fraktionen für die Datenanalyse mit MaxQuant gemeinsam analysiert.

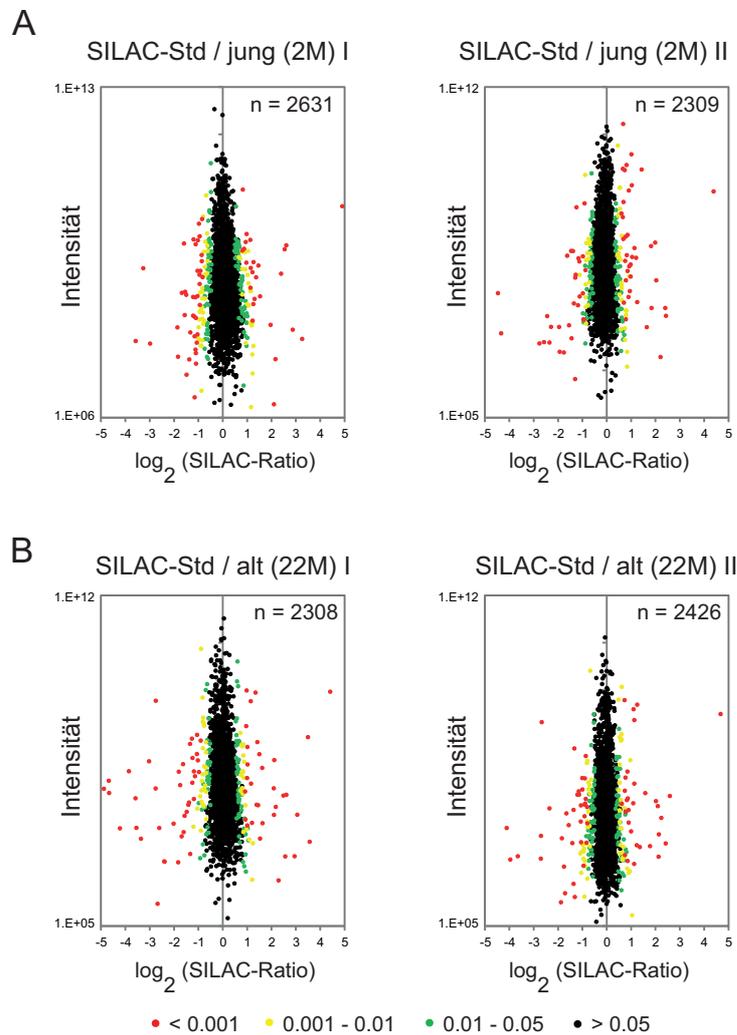


Abbildung 31.: Ergebnisse der quantitativen Proteomstudie von Kardiomyozyten im Alter von 22 Monaten. Streudiagramme der SILAC-Ratios (\log_2) zwischen unmarkierten Kardiomyozyten im Alter von (A) 2 Monaten sowie (B) 22 Monaten und dem schweren Standard. Die Ratios sind gegen die Peak-Intensitäten aufgetragen und Signifikanzwerte (*significance B*) sind farbig markiert. Die experimentelle Durchführung erfolgte mit biologischen Duplikaten.

Die Ergebnisse der quantitativen Proteomstudie der einzelnen Mäuse sind in Abbildung 31 dargestellt. Auf Grund der subzellulären Fraktionierung war es möglich, in den Kardiomyozyten-Proben der jungen Mäuse 2631 bzw. 2309 Proteine zu quantifizieren, in den Proben der gealterten Kardiomyozyten belief sich die Quantifizierung auf 2308 bzw. auf

2426 Proteine. Alle Proteine wurden mit mindestens 3 Peptiden identifiziert. Die SILAC-Ratios (\log_2) der einzelnen Proben sind in Abbildung 31A und B in den Streudiagrammen gegen die jeweilige Peak-Intensität abgebildet. Wie im Kapitel 3.3 bereits beschrieben wurde, reflektiert das Farbschema der Datenpunkte den jeweiligen intensitätsabhängigen Signifikanzwert (*significance B*), welcher angibt, ob SILAC-Ratios außerhalb der Normalverteilung liegen. Die schwarzen Datenpunkte repräsentieren Proteine, die zwischen den SILAC-markierten und den unmarkierten Kardiomyozyten vergleichbare SILAC-Ratios auf Grund einer vergleichbaren Expression zeigen (*significance B* > 0,05). Diese Proteine bilden die Mehrheit der quantifizierten Proteine mit jeweils 91,3% in den Duplikaten der jungen Kardiomyozyten (SILAC-Std/jung (2M) Replikate I und II) sowie mit 90,8% und 91,3% in den gealterten Kardiomyozyten (SILAC-Std/alt (22M) Replikate I und II). Die signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine sind farbig markiert (*significance B* < 0,05) und betragen entsprechend 8,7% in den jungen Kardiomyozyten sowie 9,2% bzw. 8,7% in den alten Zellen. Anhand dieser Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Unterschiede in der Proteinexpression zwischen SILAC-markierten Kardiomyozyten und unmarkierten Herzmuskelzellen in jungen und gealterten Mäusen vergleichbar sind. Nur 8,7% der Proteine waren zwischen der jungen SILAC-Maus und den jungen unmarkierten Mäusen signifikant unterschiedlich exprimiert. Entgegen den Erwartungen konnten ebenfalls nur 8,7% bzw. 9,2% der Proteine mit einer signifikant verschiedenen Expression zwischen der jungen SILAC-Maus und den gealterten unmarkierten Mäusen detektiert werden. Daher scheint das Proteom der Kardiomyozyten kaum altersbedingte Veränderungen aufzuweisen.

Um nun die Proteinexpression der unmarkierten jungen Kardiomyozyten mit denen der unmarkierten alten Herzen zu vergleichen, wurden erneut direkte Proteinratios aus den SILAC-Ratios berechnet. Dafür wurden die logarithmierten SILAC-Ratios der Duplikate gemittelt, um den Wert der jungen Proben durch den Wert der alten Probe zu dividieren.

$$H/L(jung\ 2M) \div H/L(alt\ 22M) = alt\ 22M/jung\ 2M$$

Mit Hilfe des Perseus-Moduls von MaxQuant erfolgte die statistische Auswertung. Um die Signifikanz (p-Wert) der Proteinexpression zwischen jungen und alten Kardiomyozyten zu berechnen, erfolgte ein T-Test mit Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiples Testen anhand der SILAC-Ratios aus den biologischen Duplikaten. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse als *Vulcano plot* dargestellt. Die Expressionsverhältnisse von 2106 Proteinen (X-

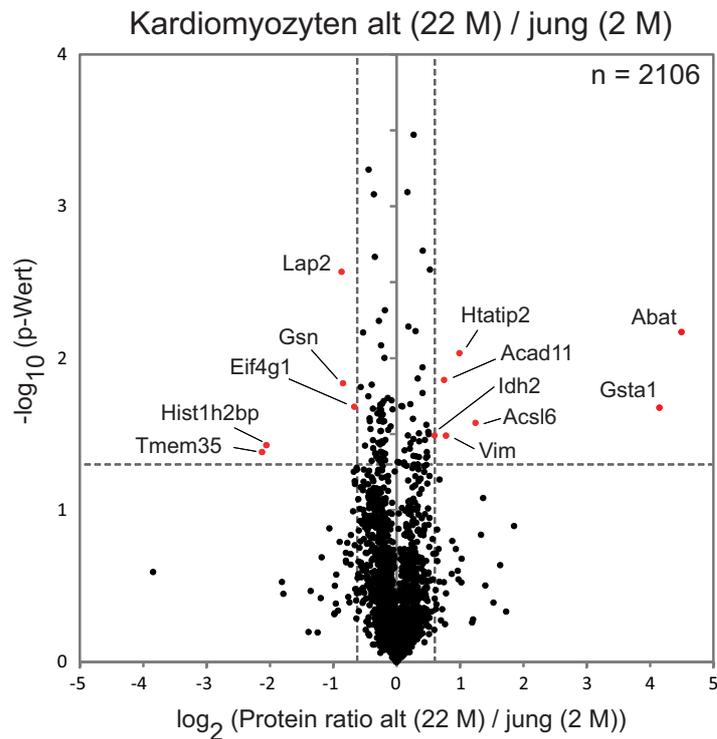


Abbildung 32.: Ergebnisse der quantitativen Proteomstudie von Kardiomyozyten im Alter von 22 Monaten. Die Expressionsverhältnisse (X-Achse) von 2106 Proteinen wurden gegen die negativ logarithmierten Signifikanzwerte ($-\log_{10}$ p-Wert, Y-Achse) aufgetragen, die mittels T-Test mit Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiples Testen anhand der biologischen Duplikate ermittelt wurden. Rote Datenpunkte repräsentieren Proteine mit einer signifikanten Regulation (mind. 1,5-fach, $p < 0,05$). Die Werte sind im Anhang in Tabelle 7 aufgelistet.

Achse) zwischen jungen und alten Zellen wurden gegen die jeweilige Signifikanz ($-\log_{10}$ p-Wert, Y-Achse) aufgetragen. Da nur 5 Proteine ($\cong 0,2\%$) mit einer signifikanten (p -Wert $< 0,05$) und mindestens zweifachen Regulation identifiziert werden konnten, wurden auch die Proteine mit einer etwas geringeren Regulation (mind. 1,5-fach, $p < 0,05$) näher betrachtet. Dabei konnten 12 Kandidaten bestimmt werden, die signifikant reguliert und in Abbildung 32 rot markiert wurden. Die Gruppe der herunterregulierten Proteine beinhaltet 5 Kandidaten wie das *Transmembrane protein 35* (Tmem35) und das Histone *H2B type 1-P* (Hist1h2bp). Es handelt sich hier um eine sehr heterogene Gruppe an Proteinen, da eine einheitliche Zuordnung in funktionelle Gruppen nicht möglich war. Im Gegensatz dazu konnten für die Gruppe der hochregulierten Kandidaten 7 Proteine identifiziert werden,

von denen 6 Proteine anhand der GO-Terme dem Keton-Metabolismus zugeordnet werden konnten. Die Zuordnung erfolgte mit dem GOrilla-Programm (*Gene Ontology enrichment anaLysis and visuaLizAtion*) (Eden et al., 2009). Bei diesen Proteinen handelt es sich um die (*S*)-3-amino-2-methylpropionate transaminase (Abat), Glutathione S-transferase A1 (Gsta1), Long-chain acyl-CoA synthetase 6 (Acsl6), Oxidoreductase HTATIP2 (Httip2), Acyl-CoA dehydrogenase family member 11 (Acad11) und die Isocitrate dehydrogenase [NADP] (Idh2). In gealterten Kardiomyozyten scheint daher ein erhöhter Bedarf an Ketonkörpern und somit ein veränderter Energiestoffwechsel im Vergleich zu jungen Herzmuskelzellen vorzuliegen.

3.5.3. Erhöhte Expression von BDH1 in Kardiomyozyten nach 30 Monaten

Um einen noch deutlicheren altersbedingten Effekt zu messen, wurde die quantitative Proteomstudie mit Kardiomyozyten aus Mäusen in einem Alter von 30 Monaten wiederholt. Die isolierten Kardiomyozyten aus drei jungen (2 Monate) und drei alten (30 Monate) Mäuse wurden in SDT-Puffer homogenisiert und in einem Verhältnis von 1:1 mit der Proteinprobe der SILAC-Maus (2 Monate) gemischt. Die Proben wurden mittels der FASP-Methode enzymatisch mit Lys-C verdaut, um die Peptide anschließend mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung zu separieren. Die Proben wurden massenspektrometrisch analysiert (LC-MS/MS). Die experimentelle Durchführung erfolgte mit biologischen Triplikaten.

Die Ergebnisse der quantitativen Proteomstudie von Kardiomyozyten im Alter von 30 Monaten ist in Abbildung 33 dargestellt. In den Streudiagrammen wurden die SILAC-Ratios (\log_2 , X-Achse) gegen die entsprechende Peak-Intensität (Y-Achse) aufgetragen. Erneut reflektiert das Farbschema der Datenpunkte den jeweiligen intensitätsabhängigen Signifikanzwert (*significance B*), welcher angibt, ob SILAC-Ratios außerhalb der Normalverteilung liegen. Es konnten 1725, 1782 bzw. 1599 Proteine in den Proben der jungen Kardiomyozyten sowie 1823, 1704 bzw. 1656 Proteine in den Proben der alten Zellen (30 Monate) quantifiziert werden. Alle Proteine wurden mit mindestens 3 Peptiden identifiziert. Proteine mit vergleichbarer Expression zwischen SILAC-markierten und den unmarkierten Kardiomyozyten (*significance B* > 0,05) wurden als schwarze Datenpunkte dargestellt und bilden die Mehrheit der quantifizierten Proteine. Die signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine sind farbig markiert (*significance B* < 0,05) und betragen in den Proben

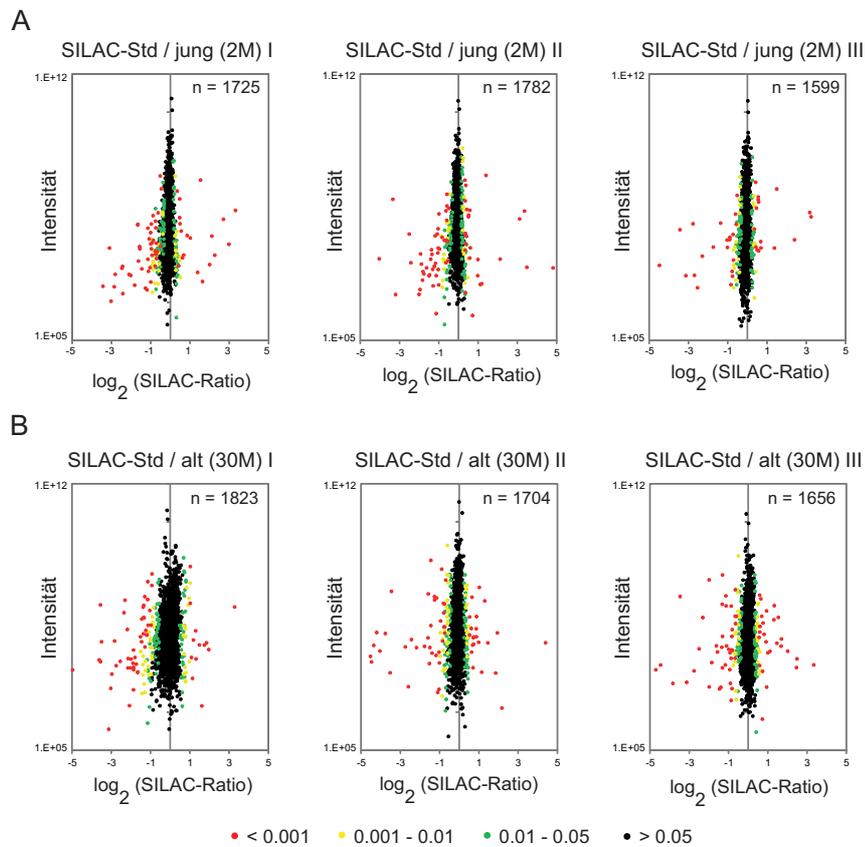


Abbildung 33.: Ergebnisse der quantitativen Proteomstudie von Kardiomyozyten im Alter von 30 Monaten. Streudiagramme der SILAC-Ratios (\log_2) zwischen unmarkierten Kardiomyozyten im Alter von (A) 2 Monaten sowie (B) 30 Monaten und dem schweren Standard. Die Ratios sind gegen die Intensität aufgetragen und Signifikanzwerte (*significance B*) sind farbig markiert. Die experimentelle Durchführung erfolgte mit biologischen Triplikaten.

der jungen Kardiomyozyten 9,7% (SILAC-Std/jung Replikate I), 10% (SILAC-Std/jung II) und 8,1% (SILAC-Std/jung III) der Proteine. In den Proben der gealterten Herzmuskelzellen konnte ebenfalls ein Anteil von 9,7% (SILAC-Std/alt (30M) I), 9,9% (SILAC-Std/alt (30M) II) und 10,2% (SILAC-Std/alt (30M) III) der Proteine detektiert werden. Wie bereits im Datensatz der gealterten Kardiomyozyten nach 22 Monaten (Kapitel 3.5.2) beschrieben wurde, ist die Differenz der globalen Proteinexpression zwischen den jungen SILAC-markierten und unmarkierten Herzmuskelzellen von jungen und gealterten Mäusen vergleichbar. Ein deutlicher altersbedingter Effekt war im Vergleich zum jungen SILAC-Proteom nicht erkennbar.

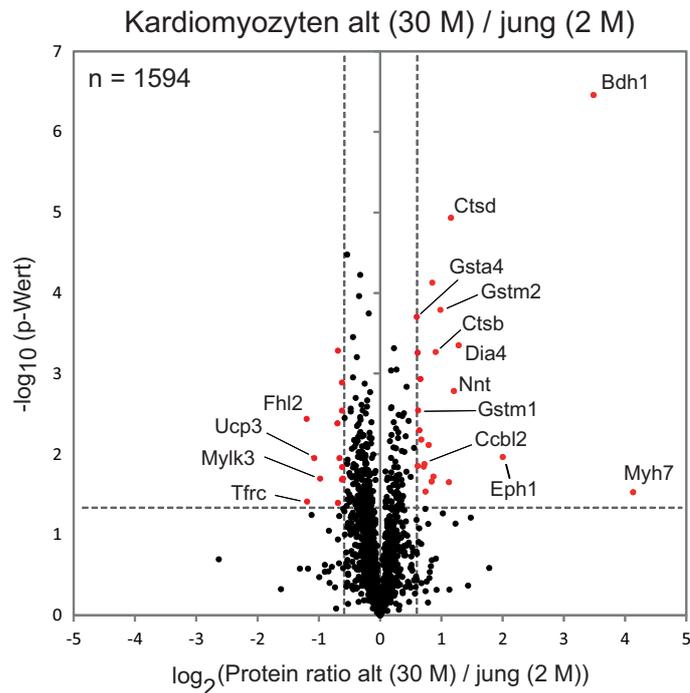


Abbildung 34.: Ergebnisse der quantitativen Proteomstudie von Kardiomyozyten im Alter von 30 Monaten. Die Expressionsverhältnisse (X-Achse) von 1594 Proteinen wurden gegen die negativ logarithmierten Signifikanzwerte ($-\log_{10}$ p-Wert, Y-Achse) aufgetragen, die mittels T-Test mit Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiples Testen anhand der biologischen Duplikate ermittelt wurden. Rote Datenpunkte repräsentieren Proteine mit einer signifikanten Regulation (mind. 1,5-fach, $p < 0,05$). Die Werte sind im Anhang in Tabelle 8 aufgelistet.

Der Vergleich des Expressionsniveaus zwischen unmarkierten jungen und alten Kardiomyozyten basiert erneut auf der Bestimmung der direkten Proteinratios. Dafür wurden die logarithmierten SILAC-Ratios der Triplikate gemittelt, um den Wert der jungen Proben durch den Wert der alten Probe zu dividieren.

$$H/L(\text{jung } 2M) \div H/L(\text{alt } 30M) = \text{alt } 30M / \text{jung } 2M$$

Zur Bestimmung der Signifikanz (p-Wert) der Proteinexpression zwischen jungen und alten Kardiomyozyten erfolgte erneut ein T-Test mit Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiples Testen anhand der SILAC-Ratios aus den biologischen Triplikaten. In der Abbildung 34 sind die ermittelten Expressionsverhältnisse (X-Achse) von 1594 Proteinen zwischen

Kardiomyozyten in einem Alter von 2 und 30 Monaten gegen die entsprechenden Signifikanzwerte ($-\log_{10}$ p-Wert, Y-Achse) aufgetragen. Anhand des *Vulcano plots* konnten 10 Proteine ($\cong 0,6\%$) identifiziert werden, die signifikant und mehr als zweifach reguliert sind. Da erneut nur ein sehr kleiner Anteil regulierter Proteine bestimmt werden konnte, erfolgte wieder die nähere Betrachtung von Proteinen mit einer geringeren Regulation von 1,5-fach ($p < 0,05$). Dabei konnten 38 Kandidaten bestimmt werden, die signifikant reguliert und in Abbildung 34 rot markiert wurden. Die Gruppe der herunterregulierten Kandidaten, die 14 Proteine umfasst, fiel erneut sehr heterogen aus, da verschiedene Proteine wie die Transporterproteine *Transferrin receptor protein 1* (Tfrc) und das *Mitochondrial uncoupling protein 3* (Ucp3) oder die *putative myosin light chain kinase 3* (Mylk3) detektiert wurden. Über UCP3 ist bisher bekannt, dass es im Skelett- und Herzmuskel exprimiert wird und am Energiemetabolismus sowie am Schutz der Mitochondrien gegenüber oxidativem Stress beteiligt ist (Goglia und Skulachev, 2003; Choi et al., 2007). Ein Zusammenhang zwischen der altersbedingten Abnahme von UCP3 und einer zunehmenden Schädigung der Mitochondrien durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) wurde bereits beschrieben werden (Nabben et al., 2008). Des Weiteren wurde das *Four and a half LIM domains protein 2* (Fhl2) mit einer verringerten Expression von -1,2 (\log_2) identifiziert, welches in der kardiovaskulären Entwicklung eine wichtige Rolle spielt (Chu und Chen, 2011).

In der Gruppe der altersspezifisch hochregulierten Kandidaten konnten 24 Proteine mit einer signifikanten und mindestens 1,5-fachen Regulation detektiert werden. In der Abbildung 34 sind diese Proteine rot dargestellt, wie z.B. das *Myosin heavy chain 7* (Myh7), die *3-hydroxybutyrate dehydrogenase* (Bdh1), *Epoxide hydrolase 1, microsomal* (Eph1) und *Azoreductase* (Dia4) sowie das *Cathepsin D* (Ctsd) und *Calumenin* (Calu). Mit der höchsten Signifikanz und einer elffach höheren Expression (\log_2 ratio: 3,48) in gealterten Kardiomyozyten im Vergleich zu jungen Zellen konnte BDH1 bestimmt werden. Bisher ist bekannt, dass BDH1 in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und an der Umwandlung von Ketonkörpern beteiligt ist (Guder et al., 1983). Eine altersspezifische Expression konnte bisher aber nicht beschreiben werden. Die stark erhöhte Expression von BHD1 weist auf einen erhöhten Bedarf an Ketonkörpern in gealterten Kardiomyozyten hin. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch im Datensatz der gealterten Kardiomyozyten nach 22 Monaten (Kapitel 3.5.2) beschreiben werden, da 6 von den 7 signifikant heraufregulierten Proteinen dem Keton-Metabolismus zugeordnet werden konnten.

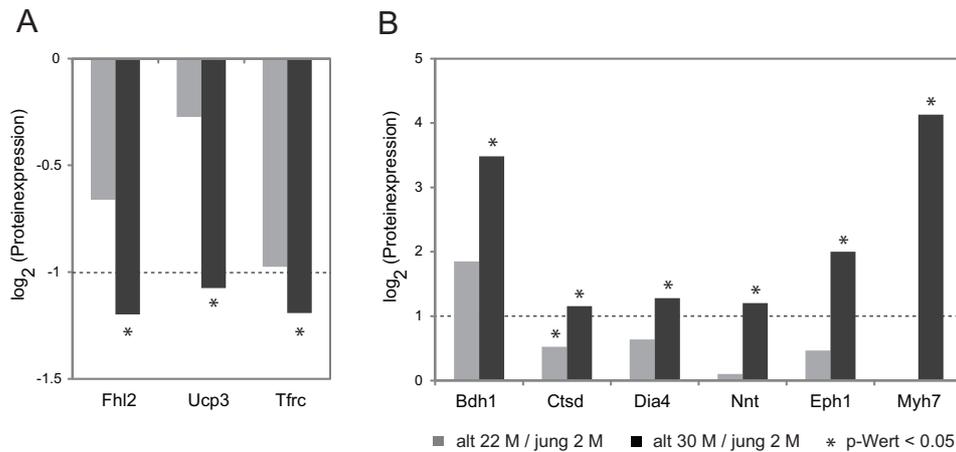


Abbildung 35.: Vergleich der altersspezifisch regulierten Kandidaten zwischen Kardiomyozyten im Alter von 22 und 30 Monaten.

Der Vergleich altersspezifisch regulierter Kandidaten zwischen Kardiomyozyten nach 22 und 30 Monaten zeigt, dass auch zum früheren Zeitpunkt der Herzalterung (22 Monate) eine ähnliche Regulation der Proteine vorliegt. In Abbildung 35A sind die Expressionsverhältnisse der herunterregulierten Kandidaten zu beiden Zeitpunkten aufgetragen. Proteine, die nach 30 Monaten signifikant herunterreguliert wurden, konnten auch in den Kardiomyozyten im Alter von 22 Monaten als herunterreguliert detektiert werden, wobei die Expression etwas geringer und nicht signifikant ausfiel. FHL2 und UCP3 konnten zum Zeitpunkt 22 Monate mit einer Expression von -0,66 und -0,27 ($-\log_2$) detektiert werden. Entsprechende Aussagen konnten auch über die hochregulierten Kandidaten getroffen werden. Abbildung 35B zeigt die Expressionsverhältnisse der altersspezifisch stärker vorkommenden Proteine in Kardiomyozyten zu beiden Zeitpunkten. Das Protein BDH1 konnte auch zum Zeitpunkt 22 Monate mit einer Expression von 1,85 (\log_2) und einem dicht an der Grenze liegenden Signifikanzwerte ($p = 0,054$) detektiert werden. Weitere Kandidaten zeigen zu diesem Zeitpunkt ebenfalls eine erhöhte Expression im Vergleich zu jungen Kardiomyozyten, allerdings fällt diese nicht so stark wie zum Zeitpunkt 30 Monate aus. Das Muskelprotein *Myosin heavy chain 7* (Myh7) konnte zum früheren Zeitpunkt ohne Regulation detektiert werden. Erst nach 30 Monaten konnte eine Zunahme beschrieben werden. Nur das Proteine *Calumenin* (Calu) konnte zum Zeitpunkt 22 Monate nicht identifiziert werden.

Die altersspezifische Regulation der hier beschriebenen Kandidaten konnte als Verlauf

für beide Zeitpunkte gezeigt werden. Des Weiteren konnte beschrieben werden, dass in gealterten Kardiomyozyten wahrscheinlich ein veränderter Energiemetabolismus vorherrscht, da Proteine des Keton-Metabolismus zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine signifikant erhöhte Expression ausweisen. Zusammenfassend gilt aber zu bemerken, dass nur minimale altersbedingte Veränderungen in der globalen Proteinexpression detektiert werden konnten. Daher war eine altersspezifische und signifikante Anreicherung von GO-Termen weder mit dem ResA- noch mit dem GOrilla-Programm möglich. Die altersbedingte Adaption des Kardiomyozyten-Proteoms erscheint daher nur schwach ausgeprägt.

4. Diskussion

Der Begriff Proteomics beschreibt die Analyse der globalen Proteinexpression einer Zellpopulation oder eines Organismus. In den letzten Jahren ermöglichte die Entwicklungen von hochauflösenden Massenspektrometern sowie deren Kopplung mit nano-HPLC-Systemen eindrucksvolle Studien von komplexen Proteinproben. Mit Hilfe der MS-basierenden Proteomics kann nun die relative sowie die absolute Expression eines Protein bestimmt werden, posttranslationale Modifikationen (PTM) können detektiert und Proteininteraktionen aufgeklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die quantitative Proteinanalyse des Herzens gelegt. Um herzspezifische Veränderungen während der embryonalen Entwicklung sowie den Einfluss des Protein-*knockdowns* von ALCAM auf die Herzentwicklung zu analysieren, wurde eine SILAC-basierende Methode zur Proteinquantifizierung für den Zebrafisch etabliert. Des Weiteren wurden altersbedingte Veränderungen im Proteom von Maus-Kardiomyozyten studiert.

4.1. Identifikation und Quantifikation von Proteinen mittels modernen Methoden der Proteomics

Die Methode der sog. *shotgun* Proteomics beinhaltet die proteolytische Spaltung einer komplexen Proteinprobe zu Peptiden, die anschließend mittels einer nano-HPLC chromatographisch aufgetrennt und in einem Tandem-Massenspektrometer analysiert werden (Aebersold und Mann, 2003). Moderne Massenspektrometer besitzen eine hohe Auflösung, um einzelne Peptide innerhalb einer komplexen Probe zu detektieren. Daher ist es heutzutage möglich, über 10.000 Proteine mit einer hohen Präzision aus Zelllinien zu identifizieren (Geiger et al., 2012; Nagaraj et al., 2011). Dennoch ist die Analyse vollständiger Proteome, v.a. bei differenzierten Zellen, auf Grund des dynamischen Bereichs (*dynamic range*) der

Proteinexpression eine Herausforderung. Die Proteinexpression kann, wie z.B. im Blutserum, in einem dynamischen Bereich von 7 bis 12 Größenordnungen liegen (Corthals et al., 2000). In Hefezellen war es nun möglich, Proteine mit einer Expression von 41 bis $1,3^6$ Kopienzahlen pro Zelle zu detektieren und somit 4,5 Größenordnungen der Proteinexpression abzudecken (Picotti et al., 2009). Die Herausforderung dabei ist die Detektion von niedrig-abundanten Proteinen, bei denen es sich häufig um Regulatoren zellulärer Prozesse wie Transkriptionsfaktoren handelt. Vor allem in differenzierten Zellen wie den Kardiomyozyten ist es auf Grund der hohen Abundanz von strukturellen und mitochondrialen Proteinen schwierig, Proteine mit einer geringen Expression zu detektieren (Kapitel 3.1).

4.1.1. Differenzierte Zellen limitieren die massenspektrometrische Analyse

In der Arbeit wurde die Eignung von Kardiomyozyten für die massenspektrometrische Analyse beschrieben (Kapitel 3.1). Für diesen Ansatz wurden embryonale Stammzellen (ES-Zellen), Muskelvorläuferzellen (C₂C₁₂-Myoblasten), isolierten Kardiomyozyten sowie ein gesamtes Mausherzen für eine Vergleichsanalyse eingesetzt. Auf Grund der hohen Komplexität der Herzmuskelzellen basierend auf dem hohen Anteil struktureller und mitochondrialer Proteine, sinkt die Anzahl identifizierbarer Proteine stark ab (Abbildung 8). Dennoch konnten im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 3254 Proteine aus isolierten Maus-Kardiomyozyten identifiziert werden. In vergleichbaren, aktuellen Studien über das Herzproteom ist der Einfluss des spezialisierten Zelltyps ebenfalls zu erkennen. Mit Hilfe der SILAC-Maus wurden der linke und rechte Ventrikel eines Mausherzens verglichen (Scholten et al., 2011). In dieser Studie konnten, unter Verwendung der Metalloendopeptidase Lys-N, 3749 Proteine identifiziert werden. Walther und Mann (2011) erzielten die Identifikation von 2626 Proteinen aus dem Herzgewebe. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde dabei das Enzym Lys-C verwendet. Im Vergleich dazu heben sich die Ergebnisse aktueller MS-Analysen von Zelllinien deutlich ab. Basierend auf den neusten Techniken konnten in 11 humanen Zelllinien jeweils etwa 10.360 Proteine identifiziert werden (Geiger et al., 2012). Die Analyse von HeLa-Zellen ergab eine Identifikation von 10.255 Proteinen (Nagaraj et al., 2011). Um die Anzahl identifizierbarer Proteine aus Kardiomyozyten zu erhöhen, muss die Komplexität der Zellen mit Hilfe von Methoden zur Proteomauftrennung verringert werden. Allerdings wird die Identifikation des gesamten Proteoms differenzierter Zellen mit wenig hoch-abundanten Proteinen wohl noch etwas länger eine Herausforderung bleiben.

4.1.2. Die Vorteile der SILAC-basierenden Proteinquantifizierung

Von zentraler Bedeutung in der MS-basierenden Proteomics ist die Proteinquantifizierung, die jedoch mittels eines Massenspektrometers per se nicht möglich ist. Daher wurden verschiedene Methoden zur Proteinquantifizierung etabliert, die entweder auf der Markierung mit stabilen Isotopen oder auf der *label-free*-Quantifizierung beruhen. Die Markierung mit stabilen Isotopen führt zu einer Massendifferenz zwischen zwei Proteomen und kann als interner Standard zur relativen Quantifizierung verwendet werden. Die Verwendung stabiler Isotope kann dabei mittels einer chemischen Markierung erfolgen, z.B. durch die Markierung von Peptiden mit Isotopen-gekoppelten Tags (iTRAQ, *isobaric tags for relative and absolute quantitation*) (Ross et al., 2004), oder mittels einer metabolischen Markierung. Dabei werden Proteine auf Grund des Zellmetabolismus mit stabilen Isotopen markiert, z.B. durch die Inkorporation von Isotopen-markierte Aminosäuren (SILAC) (Ong und Mann, 2006). Die detaillierte Durchführung eines SILAC-Experiments ist bereits in Kapitel 1.8.2 beschrieben worden.

Die Vor- und Nachteile der chemischen und metabolischen Markierung liegen v.a. in der experimentellen Durchführung sowie in der Präzision der Quantifizierung. Da die chemische Markierung von Proteinen bzw. Peptiden erst nach der Zellyse und Proteinextraktion erfolgt, kann nahezu jede Probe markiert werden, unabhängig vom Organismus oder Zelltyp (z.B. humane Proben). Allerdings müssen die zu vergleichenden Proben parallel aufgearbeitet werden und können erst zu einem späten Zeitpunkt in der experimentellen Durchführung gemischt werden. Dadurch entstehen hohe Variationen zwischen den Proben, die zur Detektion von unspezifisch-regulierten Proteinen führen. Im Vergleich dazu erfolgt die metabolische Markierung in der lebenden Zelle, wodurch die zu vergleichenden Proben sehr früh in der experimentellen Durchführung gemischt werden können. Die Variationen bleiben dadurch minimal, wodurch die metabolische Markierung z.B. mit SILAC eine sehr hohe Präzision in der Proteinquantifizierung ermöglicht. Des Weiteren kann die SILAC-basierende Quantifizierung zur Bestimmung des Protein-*turnovers* verwendet werden, wenn eine partielle (*pulse*) SILAC-Markierung einer Zelllinie erfolgt (Schwanhauser et al., 2011). Ein weiterer Vorteil liegt in der Identifikation von posttranslationalen Modifikationen (PTM). Da PTMs auf Peptidebene detektiert werden, erfolgt in einem SILAC-Experiment deren Identifikation mit hoher Präzision über ein Peptidpaar (Drexler et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Modellorganismus Zebrafisch metabolisch nach der SILAC-Methode markiert. Die Etablierung einer vollständigen Markierung mit der Isotopen-markierten Aminosäure Lysin-6 sollte erfolgen, um eine robuste und hochwertige Proteinquantifizierung im Zebrafisch zu ermöglichen.

4.2. Die Etablierung des SILAC-Zebrafisches

4.2.1. Die Verwendung von SILAC ermöglicht Proteinstudien in Zebrafischen

Den Zebrafisch als einen SILAC-Modellorganismus zu etablieren, eröffnet viele Vorteile, die bereits im Kapitel 1.3 beschrieben wurden. Der Zebrafisch ist ein Modellsystem, dessen Genomsequenz bekannt ist und der vor allem für *Screening*-Studien eingesetzt wird. Dabei werden genetische *forward* Techniken angewendet, um eine zufällige Mutagenese z.B. mittels ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) zu induzieren und anschließend den Phänotyp zu analysieren (Solnica-Krezel et al., 1994). Herzspezifische Phänotypen können auf diesem Wege nach Genen untersucht werden, die eine entwicklungsbiologische Relevanz aufweisen (Langenbacher et al., 2011). Des Weiteren wird der Zebrafisch auf Grund der optischen Transparenz der Embryonen oft für bildgebende Studien z.B. zur Aufklärung von embryonalen Entwicklungen oder von Regenerationprozessen eingesetzt (Kikuchi et al., 2010).

Im Gegensatz zu *Screening*- und bildgebenden Studien wurden bisher nur wenige Proteinstudien zum Zebrafisch veröffentlicht (Forne et al., 2010). Häufig erfolgen die quantitativen Analysen dieser Studien mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese, mit der es möglich ist, über 1000 Proteinspots zu visualisieren. Eine Identifikation erfolgt aber häufig nur bei einigen hundert, hoch abundanten Proteinen (Cox und Mann, 2011). Des Weiteren wurden nur vereinzelt Studien zum globalen Phosphoproteom im Zebrafisch veröffentlicht, wobei die Quantifizierung auf einer *label-free*-Methode bzw. einer chemischen Markierung beruht (Soderblom et al., 2011; Lemeer et al., 2008a). Ein Nachteil bei Proteinstudien basierend auf dem Zebrafisch ist die geringe Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern, wodurch der Nachweis von Proteinen mittels *Western Blot* oder *Whole-mount*-Antikörperfärbung limitiert ist.

Besonders für der Herzforschung ist der Zebrafisch ein exzellenter Modellorganismus, um humane Herzerkrankungen zu studieren. Bisher konnte eine Vielzahl von Zebrafisch-Mutanten beschrieben werden, deren Herzphänotyp Gemeinsamkeiten mit humanen Kardiomyopathien aufzeigen (Bakkers, 2011). Des Weiteren eröffnet die Identifikation mutierter Gene im Zebrafisch die Möglichkeiten, gezielt die genetischen Veränderungen erkrankter Menschen zu untersuchen. Ein Beispiel dafür ist das herzspezifische Troponin 2. Eine Mutation im Gen *tnnt2* führt beim Menschen zur dilatativen Kardiomyopathie (DCM) (Sehnert et al., 2002). Die Zebrafisch-Mutante *silent-heart/tnnt2* ist daher ein exzellentes Modell, die Funktion des Proteins zu studieren. Weiterhin können grundlegende Entwicklungsprozesse während der Herzmorphogenese sowie die Beteiligung einzelner Proteinen an diesen Vorgängen untersucht werden. Z.B. führt der *knockdown* von ALCAM zu einer fehlerhaften Herzentwicklung, da der *Looping*-Prozess zwischen Atrium und Ventrikel nicht vollständig abläuft (Diekmann und Stuermer, 2009). Quantitative Proteinstudien würden zusätzlich zur Aufklärung der Proteinfunktion beitragen.

Um globale, quantitative Proteomstudien nicht nur in Zelllinien, sondern auch in mehrzelligen Organismen anwenden zu können, wurde die SILAC-Technik auf verschiedene Modellorganismen übertragen. Im Vergleich zu SILAC-Modellorganismen wie *D. melanogaster*, *C. elegans* und *M. musculus* konnte allerdings eine metabolische Markierung des Zebrafisches mit stabilen Isotopen lange nicht ermöglicht werden. Auf Grund des Mangels an einer verfügbaren Ernährung, um die markierten Aminosäuren aufzunehmen, konnte eine vollständige Markierung der Fische bisher nicht beschrieben werden (Gouw et al., 2010). Eine partielle Markierung mit Lysin-6 wurde durch die Fütterung mit dem SILAC-Mausfutter erreicht (Westman-Brinkmalm et al., 2011). Allerdings beträgt in diesem Ansatz die durchschnittliche Markierungsrate in den Organen nur 40%, nicht ausreichend für relative quantitative Proteinstudien. Infolge der Ernährung mit Mausfutter entwickelten sich die Fische nicht vollständig und blieben unfruchtbar, wodurch die Fütterung nach 4 Monaten wieder eingestellt wurde. Eine vollständige Markierung der Zebrafische konnte somit nicht erreicht werden, wodurch gezeigt wurde, dass ein Futter speziell für Fische entwickelt werden muss, um Zebrafische vollständig metabolisch zu markieren.

4.2.2. Die Ernährung der Zebrafische mit SILAC-Futter führt zu einer verringerten Körpergröße

Um Zebrafische mit stabilen Isotopen zu markieren, wurde ein SILAC-Fischfutter entwickelt, welches aus vollständig Lysin-6-markierten Zellen von *E. coli* und *S. cerevisiae* sowie aus Gewebe der SILAC-Maus und SILAC-Mausfutter besteht (Kapitel 3.2.1). Für die Ernährung der Zebrafischlarven wurde anstelle des SILAC-Mausgewebes vollständig markierte Larven von *D. melanogaster* verwendet, wodurch ein Futter mit kleiner Partikelgröße generiert werden konnte.

Die Ernährung der Fische mit dem SILAC-Futter verlief erfolgreich. Die Fische wiesen normale Verhaltensweisen auf und blieben aktiv. Eine Verpaarung der Weibchen mit unmarkierten Männchen der Linie BNA war ebenfalls von Erfolg. Allerdings sank die Anzahl überlebensfähiger Embryonen im Vergleich zu konventionell ernährten Fischen um 10%. Des Weiteren wurde ein verzögertes Wachstum der SILAC-Larven beobachtet (Abbildung 17). Um die Entwicklung der Larven zu fördern, erfolgte die Zugabe von nicht markiertem Futter einmal pro Woche in den ersten sechs Lebenswochen. Zwar wurde eine geringe Kontamination mit leichten Aminosäuren und dadurch eine Reduktion der durchschnittlichen Lysin-6-Markierung auf 76% beobachtet, jedoch konnte auf Grund des extremen Größenzuwachs der Fische dieser Effekt später vernachlässigt werden, da in den adulten Fisch der F1-Generation eine SILAC-Markierung von 95% detektiert wurde. Eine Züchtung der SILAC-Zebrafische über mehrere Generationen ist mit dem entwickelten Futter somit möglich.

Um die negativen Effekte des SILAC-Futters auf die Entwicklung der Fische zu minimieren, wäre eine veränderte Kombination der Futterkomponenten oder die Zugabe weitere Bestandteile sinnvoll. Da die Zusammensetzung des Futters auf Zellen von *E. coli* und *S. cerevisiae* sowie auf Gewebe von *D. melanogaster* und der SILAC-Maus beruht, sind die einzelnen Nährstoffanteile nicht bekannt. Eine Möglichkeit könnte eine quantitative Aminosäureanalyse zwischen kommerziellem und dem SILAC-Futter sein, um den Proteinanteil des Futters zu bestimmen. Allerdings ist ein einheitlicher Standard selbst bei kommerziellem Fischfutter nicht gegeben, da der Proteinanteil von 31% bis 60% und der Anteil an Lipiden zwischen 5% und 34% variiert (Siccardi et al., 2009). Eine Ernährung mit Lebendfutter wird häufig durch die Krebstiere *Artemia sp.* erreicht. Deren Nährwertprofil

(i.Tr.) besteht aus 13,5% Mineralien, 3,6% Kohlenhydrate, 9,5% Lipide und 50,8% Proteine. Um eine optimale Ernährung für Fische zu gewährleisten, dient die Zusammensetzung von *Artemia* häufig als Vorlage für das Nährwertprofil von kommerziellem Fischfutter.

Um die Ernährung der SILAC-Zebrafisch zu verbessern, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, eine biologische Nahrungskette zu entwickeln. Dafür sollten der Salzkrebs *Artemia salina* und der Wasserfloh *Daphnia pulex* mit Lysin-6 markiert werden, um als Lebendfutter für die SILAC-Fische zu dienen. Obwohl die Tiere in einen Zeitraum von 5 Monaten mit Lysin-6-markierter Hefe über mehrere Generationen kultiviert wurden, konnte nur eine partielle Markierung von 48% (*Artemia*) und 46% (*Daphnia*) erreicht werden (Anhang A Abbildung 37). In der Studie von Morais et al. (2004) konnte allerdings gezeigt werden, dass eine vollständige Markierung der *Artemia* mit radioaktivem ^{14}C möglich ist. In der Veröffentlichung wurden eine ^{14}C -Inkorporation von 96,5% in frisch geschlüpften Nauplien beschrieben, der Einfluss einer längeren Kultivierung wurde aber nicht dokumentiert. Des Weiteren konnte ein hohe Aktivität von bakteriellen Kontaminationen gezeigt werden, die zu einer metabolische Umsetzung von 20% des ^{14}C führten. In der vorliegenden Langzeitkultivierung könnten die Bakterien auf diesem Wege zu einer Ausdünnung der Lysin-6-Markierung geführt haben, da sie zur Synthese von Proteinen und Aminosäuren fähig sind.

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung des SILAC-Fischfutters ist ein erhöhter Anteil an Fliegenlarven, um einen ausreichenden Anteil an Proteinen zu gewährleisten. Des Weiteren könnte getestet werden, ob der Lipidanteil durch Zugabe von Öl erhöht werden sollte. Die zusätzliche Anreicherung mit Vitaminen erbrachte dagegen keinen positiven Effekt auf die Entwicklung der SILAC-Zebrafische.

4.2.3. Die partielle SILAC-Markierung reflektiert die Beschaffenheit verschiedener Gewebetypen anhand von Markierungsraten

In der vorliegenden Arbeit wurde die partielle SILAC-Markierung verwendet, um die Inkorporationsraten von Lysin-6 in Proteine verschiedener Organe und Gewebetypen zu dokumentieren. Die Inkorporation wurde dabei als prozentuale Markierungsrate verrechnet (Kapitel 3.2.2). Allerdings wurden keine absoluten Halbwertszeiten der Proteine bestimmt. Diesbezüglich sollten postmitotische Zellen zugrunde gelegt werden, die nicht proliferie-

ren. Im mitotischen Gewebe wie dem Darm oder dem Blutsystem würden die Halbwertszeiten durch die Neusynthese der Proteine aufgrund der Zellteilung überlagert werden. Im Vergleich dazu ist die Bestimmung von Halbwertszeiten in Zellkultursystemen auch mit proliferierenden Zellen möglich. In der Studie von Schwanhausser et al. (2011) wurden NIH3T3 Mausfibroblasten in SILAC-Medium kultiviert. Anhand der partiellen (*pulse*) SILAC-Markierung wurden zu drei Zeitpunkten die Halbwertszeiten basierend auf SILAC-Einbauraten berechnet. Der Einfluss der leichten Aminosäuren, die gespeichert in den Zellen vorlagen, blieb dabei minimal und hat die Inkorporation der schweren Aminosäuren nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu muss der Pool an leichten Aminosäuren bei *in vivo* SILAC-Markierungen in lebenden Tieren berücksichtigt werden, um Halbwertszeiten in Organismen zu bestimmen. Leichte Aminosäuren liegen gebunden in Proteinen sowie frei im Gewebe vor. Der Anteil schwerer Aminosäuren wird somit verdünnt und deren Inkorporation verringert. Weiterhin werden etwa 80% der degradierten Proteine für die Neusynthese verwendet. Um daher exakte Halbwertszeiten zu berechnen, muss zu jedem Zeitpunkt das Verhältnis von leichten zu schweren Aminosäuren bestimmt werden. Anhand dieses Faktors, dem sog. RIA (*relative isotope abundance*) werden die SILAC-Einbauraten korrigiert und die absoluten Halbwertszeiten berechnet (Claydon et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der partiellen SILAC-Markierung ausschließlich die relativen Inkorporationsraten von verschiedenen Organen verglichen, um Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der verschiedenen Gewebetypen sowie auf den globalen Gewebe-*Turnover* zu ziehen.

4.2.4. Der SILAC-Zebrafisch ermöglicht die Charakterisierung regenerativer Prozesse

Eine besondere Fähigkeit der Zebrafische liegt in der Möglichkeit, verschiedene Organen wie den Herzmuskel, die Flossen, die Netzhaut, den optischen Nerv, die Leber, das Rückenmark und die sensorischen Haarzellen zu regenerieren (Tal et al., 2010). Im Vergleich dazu sind die Regenerationsprozesse der Säugetiere limitiert. Im Falle einer Schädigung können neuronale Gewebe wie das Gehirn, Rückenmark oder die Netzhaut sowie der Herzmuskel, die Gliedmaßen und die Nieren nicht erneuert werden. Die Aufklärung solcher regenerativen Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene würde unser Verständnis verbessern, warum Säugetiere diese Fähigkeiten verloren haben und die Möglichkeit eröffnen, therapeutische Maßnahmen abzuleiten.

Die Regenerationszeit der Flossen bei Zebrafischen beträgt 2 Wochen (Tal et al., 2010). Unmittelbar nach der Amputation beginnt die Wundheilung des Epithels gefolgt von der Bildung eines Blastems. Dieses Gewebe besteht aus undifferenzierten, mesenchymalen Zellen, die durch Differenzierung und Proliferation zum Wachstum des neuen Flossengewebes führen. Die regenerativen Prozesse sind abgeschlossen, sobald die Flosse die ursprünglichen Ausmaße erreicht hat. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der partiellen SILAC-Markierung regeneriertes Flossengewebe eine Woche nach der Amputation analysiert. Auf Grund der Inkorporationsraten von Lysin-6 zwischen unbeschädigtem und regenerierendem Gewebe konnten Proteine identifiziert werden, die durch den Regenerationsprozess eine erhöhte Expression aufwiesen sowie durch eine erhöhte Proliferation vermehrt Lysin-6 inkorporiert haben. Insgesamt konnten 1499 Proteine in der regenerierten und der unbeschädigten Flossen detektiert werden, von denen 1250 Proteine eine mindestens zweifach höhere SILAC-Einbaurate in der regenerierten Flosse aufwiesen. Vor allem strukturelle Proteine wie Kollagene zeichneten sich durch deutlich höhere Markierungsraten in der regenerierten Flosse aus und spiegelten somit die Regeneration und Neubildung des Gewebes wider.

Bei der Flossenregeneration der Zebrafische handelt es sich um einen epimorphen Regenerationsprozess, bei dem Knochen, Nerven, die Epidermis und Blutgefäße vollständig neu gebildet werden (Tal et al., 2010). Dafür notwendig ist die Bildung eines Blastems, in dem pluripotente Vorläuferzellen zu verschiedenen Zelltypen differenzieren, welche anschließend durch eine starke Proliferation das regenerierende Gewebe aufbauen. Eine Woche nach der Amputation konnten viele nukleäre Proteine wie Histone (z.B. *Histone H2A*, *Histone H3.2*, *Histone H2B*) oder Proteine der nukleären Lamina (*Lamin B1*, *Lamin A*) mit einer bis zu zwanzigfach höheren SILAC-Einbaurate im regenerierten Gewebe detektiert werden. Des Weiteren konnten ribosomale Proteine wie das *Ribosomal protein S9*, das *60S ribosomal protein L23* oder das *40S ribosomal protein s11* mit einer bis zu achtfach höheren Expression detektiert werden. Die hohe Abundanz nukleärer und ribosomaler Proteine weist auf eine hohe Proteinsynthese bzw. auf eine hohe Proliferation der Zellen in der regenerierten Flosse hin.

Neben den erhöhten SILAC-Einbauraten der strukturellen und ribosomalen Proteinen, welche höchstwahrscheinlich die Folge der Neubildung des Gewebes sind, konnte auch die regenerationspezifische Expression des *Heat-shock proteins 60* (Hspd1 protein, hsp60) de-

tektiert werden. Es konnte bereits beschrieben werden, dass dieses Protein an der Ausbildung des Blastems beteiligt ist und somit für den regenerativen Prozess unverzichtbar ist (Makino et al., 2005). Eine vierfach höhere Expression des *Heat-shock protein 60* in der regenerierten Flosse konnte auch in der vorliegenden Studie detektiert werden.

Eine weitere globale Proteinstudie über die Flossenregeneration in Zebrafischen wurde von Saxena et al. (2012) veröffentlicht. Allerdings wurde in diesem Ansatz die Regeneration der Flosse zu frühen Zeitpunkten zwischen einer und 72 Stunden nach der Amputation (*hours post amputation*, hpa) und mittels der 2D-Gelelektrophorese untersucht. 96 Proteine konnten als reguliert identifiziert werden. Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit konnten Strukturproteine, überwiegend Isoformen von Keratin, als stark hochreguliert identifiziert werden. Obwohl beide Studien verschiedenen Zeitpunkten der Flossenregeneration betrachten, konnten dennoch einige Kandidaten in beiden Ansätzen detektiert werden. Eine stärkere Expression der Proteine Keratin 5, 8 und 4 sowie der spannungsabhängigen Ionenkanäle VDAC 2 und 3 während der Regeneration konnte in beiden Studien belegt werden. Zusätzlich wurde VDAC 1 in der vorliegenden Arbeit als hochreguliertes Protein gefunden. Im Vergleich zu 96 regulierten Proteinen verdeutlichen die 1250 Proteine, die in der vorliegenden SILAC-Studie als regulierte Kandidaten in der regenerierten Flosse detektiert wurden, die Vorteile einer SILAC-basierenden Quantifizierung.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Studie liegt in der Identifikation von Proteinen, die spezifisch nur in der regenerierenden Flosse detektiert wurden. Zum Beispiel konnten Actinodin 2 und 4 (and2 und and4) identifiziert werden. Actinodin 1 und 2 sind wichtige Strukturkomponenten der Actinotrichia. Dabei handelt es sich um Flossenstrahlen aus Knorpel, die während der Flossenentwicklung die Stabilität des Gewebes gewährleisten. Ein *knockdown* von Actinodin 1 und 2 führte zum Verlust der Actinotrichia und somit zu einer unvollständigen Flossenentwicklung und Flossenregeneration (Zhang et al., 2010). Die Funktion der Actinodin-Proteine scheint daher in der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Flossen zu liegen, sowohl während der Entwicklung als auch während der Regeneration. Mit Hilfe der partiellen SILAC-Markierung konnte einerseits die beschriebene Funktion von Actinodin 2 bestätigt werden und andererseits ein weiteres Protein dieser Familie, Actinodin 4, identifiziert werden, welches in den Regenerationsprozess involviert ist. Hingegen konnte Actinodin 1 in der vorliegenden Studie nicht detektiert werden, da das Protein nicht in der verwendeten IPI-Proteindatenbank enthalten ist. Die Identifikation der

Actinodin-Proteine in der SILAC-basierenden Regenerationsstudie belegt eindeutig, dass mit Hilfe dieser Methode regenerative Prozesse auf neue Kandidaten untersucht werden können.

Im nächsten Schritt könnte nun eine quantitative Proteinstudie über regenerative Prozesse im Herzen erfolgen. Bisherige Ansätze beruhen weitgehend auf morphologischen Methoden oder Genexpressionsanalysen (Sleep et al., 2010). Die Regeneration des Herzen wird im allgemeinen durch chirurgische Resektion der Herzspitze oder kälteinduzierte Schädigung des Ventrikelgewebes induziert (Jopling et al., 2010; Gonzalez-Rosa et al., 2011). Basierend auf *fate-mapping* Studien konnte gezeigt werden, dass der Ursprung von neuem Herzmuskelgewebe nach einer Schädigung in bereits existierende Kardiomyozyten liegt. Differenzierte Kardiomyozyten durchlaufen einen gewissen Grad an Dedifferenzierung, um wieder zu proliferieren (Kikuchi et al., 2010; Jopling et al., 2010). Die chirurgische Resektion der Herzspitze ermöglicht allerdings nur einen Verlust von maximal 20% des Ventrikels. Um eine umfangreiche Schädigung des Gewebes mit einer elektrischen Entkopplung der Kardiomyozyten zu erlangen, etablierten Wang et al. (2011) eine genetische Zellablation von Herzmuskelzellen in adulten Zebrafischen, die zu einer Schädigung von über 60% des Ventrikelmyokards führte. Diese Studie belegt ebenfalls, dass dedifferenzierte Kardiomyozyten durch Proliferation die Schädigungen des Myokards ausgleichen. Allerdings wurden bisher keine globalen Proteinstudien veröffentlicht, welche die zellulären Anpassungen der Herzmuskelzellen während der regenerativen Prozesse beschreiben. Die Anwendung des SILAC-Zebrafisches wäre hierfür eine Möglichkeit, um die molekularen Veränderungen während der Regeneration besser zu verstehen.

4.2.5. Hohe Präzision und Reproduzierbarkeit der Proteinquantifizierung basierend auf dem SILAC-Zebrafisch

In diesem Abschnitt soll zunächst überprüft werden, ob die vollständig Lysin-6-markierten Zebrafische (Kapitel 3.2.4) die gleiche Präzision der Proteinquantifizierung wie in SILAC-Zellkulturmodellen zeigen. Die Validierung der Proteinquantifizierung basierend auf dem SILAC-Zebrafisch wurde anhand von technischen und biologischen Triplikaten durchgeführt. Eine hohe Präzision sowie eine gute Reproduzierbarkeit der detektierten SILAC-Ratios konnte in der Studie belegt werden (Kapitel 3.2.5). Die Ergebnisse zeigen, dass

sich die Quantifizierung basierend auf dem SILAC-Zebrafisch auf dem Niveau von anderen SILAC-Studien mit Zelllinien und Modellorganismen wie *D. melanogaster* oder *C. elegans* befindet (Geiger et al., 2010; Sury et al., 2010).

In der Studie von Sury et al. (2010) wurde die Reproduzierbarkeit der Proteinquantifizierung basierend auf der SILAC-Fliege anhand von technischen Duplikaten ermittelt. Aus den detektierten SILAC-Ratios der Wiederholungen wurden direkte Ratios berechnet, die eine Standardabweichung von 0,15 aufwiesen. Auf diesem Wege konnte gezeigt werden, dass die Präzision der SILAC-Quantifizierung um ein vierfaches höher als bei der Quantifizierung ohne SILAC-Standard (*label-free*) lag. In der vorliegenden Arbeit wurden anhand technischer Triplikate ebenfalls direkte Ratios berechnet (Abbildung 18). Die mittlere Standardabweichung belief sich auf 0,14 und belegt somit eine etwas höhere Präzision der Proteinquantifizierung des SILAC-Zebrafisches im Vergleich zur SILAC-Fliege.

Das Protokoll von Geiger et al. (2011) beschreibt die Verwendung von SILAC als *spike-in* Experiment. Markierte Zellen oder markiertes Gewebe von Organismen können als interner Standard für die Proteinquantifizierung eingesetzt werden. Die Präzision der Methode soll dabei auf zwei Wegen kontrolliert werden. Mindestens 90% der detektierten SILAC-Ratios zwischen leichter Probe und schwerem Standard sollten weniger als fünffach reguliert vorliegen. Die technischen und biologischen Triplikate der vorliegenden Arbeit bewegen sich in diesem Rahmen. Des Weiteren soll der mittlere Variationskoeffizient zwischen SILAC-Ratios von Wiederholungsmessungen nur wenige Prozent betragen. In der vorliegenden Validierungsstudie konnte ein mittlerer Variationskoeffizient für die technischen Triplikate von 1,4% und für die biologischen Triplikate von 4,5% ermittelt werden (Anhang A Abbildung 40). Die Präzision der Proteinquantifizierung mit dem SILAC-Zebrafisch entspricht somit der hohen Genauigkeit von SILAC-Experimente in Zellkultursystemen (Geiger et al., 2010). Somit vereinigt der SILAC-Zebrafisch die Vorteile der präzisen Proteinquantifizierung mit der Möglichkeit der vielseitigen Anwendung, da der Fisch z.B. für die Analysen von Entwicklungs- und Regenerationsprozesse, für Studien verschiedener Gewebetypen sowie für Studien transgener Organismen genutzt werden kann. .

4.3. Quantitative Proteomstudie der embryonalen Herzentwicklung in Zebrafischen

Nach der statistischen Validierung der Präzision der Proteinquantifizierung basierend auf dem SILAC-Zebrafisch, wurde nun der Fisch als interner Standard für eine globale, quantitative Proteinstudie verwendet, um zwei Zeitpunkten der späten embryonalen Herzentwicklung zu charakterisieren (Kapitel 3.3). Um embryonale Herzen zum Zeitpunkt 72 und 120 hpf aus Embryonen zu isolieren, wurde die Zebrafischlinie *Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)*^{s883} verwendet, die sich durch eine herzspezifische grüne Fluoreszenz auszeichnet (D'Amico et al., 2007). Die Lysate der isolierten, unmarkierten Herzen wurden anschließend mit dem Lysat von vollständigen SILAC-Embryonen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, im Gel enzymatisch mit Lys-C verdaut und massenspektrometrisch analysiert.

Zum Zeitpunkt 72 hpf konnte eine Anreicherung von Proteinen beschrieben werden, die an der DNA-Replikation, Transkription und Translation beteiligt sind. Die Ergebnisse beweisen, dass im Vergleich zum Zeitpunkt 120 hpf eine erhöhte Synthese zellulärer Proteine infolge einer hohen Zellproliferation erfolgt (Kapitel 3.3). Als Beispiel wurde die spezifische Expression des Proteins PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) zum Zeitpunkt 72 hpf gezeigt (Abbildung 22). PCNA spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation, bei Reparaturprozessen der DNA sowie epigenetischen Vorgängen (Kirchmaier, 2011). Daher wird PCNA häufig als Marker für proliferierende Zellen verwendet. In der Studie von Contreras-Ramos et al. (2009) wurden anhand der Expression von PCNA proliferierende Kardiomyozyten während der Ventrikel- und Septumentwicklung in Hühnerembryonen studiert. Dabei konnte belegt werden, dass zum späten Zeitpunkt der Herzentwicklung der Abschluss der ventrikuläre Organogenese mit einer abnehmenden Proliferation der Kardiomyozyten einhergeht. Anschließend erfolgt die Ausdifferenzierung der Herzmuskelzellen, um den Ventrikel vollständig aufzubauen. Die Morphogenese des Ventrikel und Septums wurde daher anhand des Hühnermodells in drei Entwicklungsphasen zusammengefasst. Innerhalb der ersten drei Tage der embryonalen Entwicklung (*days post fertilization*, dpf) beginnt die Ausbildung der Ventrikel, sowie der *Looping*-Prozess und die AV-Knotenbildung. Diese Phase entspricht der Zebrafischentwicklung zwischen 24 und 48 hpf (Kapitel 1.4.3). In der anschließenden morphogenetischen Phase bis 8 dpf findet hauptsächlich die Proliferation der Kardiomyozyten statt. In der Entwicklung der Zebrafische entspricht diese Zeitspanne

in etwa 48 bis 72 hpf. Nach 8 dpf erfolgt im Hühnerembryo die vollständige Ausdifferenzierung der Kardiomyozyten und somit der komplexe Aufbau der Ventrikelwand. Im Vergleich zum Zebrafisch beginnt diese Phase in etwa 72 Stunden nach der Befruchtung.

Der Übergang von proliferierenden zu ausdifferenzierten Kardiomyozyten wird auch in der vorliegenden Studie der embryonalen Herzentwicklung deutlich. Im Zebrafisch konnten zum Zeitpunkt 72 hpf Proteine der Transkription (u.a. der Transkriptionsfaktor *Tyrosine-protein kinase BAZ1B*) und der Translation (u.a. die *Seryl-tRNA synthetase*) als hochreguliert detektiert werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Kardiomyozyten proliferieren. Dahingegen werden strukturelle Proteine der Sarkomere, Calcium-bindende Proteine und Proteine des Energiehaushaltes stärker zum Zeitpunkt 120 hpf exprimiert. Als Beispiel wurde die Expression von Nebulin dargestellt (Abbildung 22). Nebulin ist ein großes Strukturprotein der Sarkomere, welches die Länge der dünnen Filamente sowie die Muskelkontraktion beeinflusst (Ottenheim et al., 2012). Weitere hochregulierte Proteine zum Zeitpunkt 120 hpf, die mit der kardialen Kontraktion assoziiert sind, wurden in Abbildung 23 dargestellt. Die charakteristische Proteinexpression zum späteren Zeitpunkt der Herzentwicklung weist auf eine stärkere Differenzierung der Kardiomyozyten hin. Die Zellen scheinen einen höheren Anteil kontraktile Einheiten zu besitzen und zeichnen sich auf Grund der Kontraktion durch einen erhöhten Energiebedarf aus.

Bisher wurden nur zwei globale Proteinstudien zur embryonalen Entwicklung in Zebrafischen veröffentlicht. Beide Studien basieren allerdings auf vollständigen Embryonen und beschreiben daher nicht die Entwicklung einzelner Organe. In der Veröffentlichung von Tay et al. (2006) wurden 10 Zeitpunkte der embryonalen Entwicklung von 6 hpf bis eine Woche nach der Befruchtung mittels der 2D-Gelelektrophorese untersucht. Allerdings erfolgte die Identifizierung von 108 Proteine größtenteils nur bis 24 hpf. Unter den detektierten Proteine befanden sich vor allem Proteine des Dottersacks (Vitellogenine), Hitzeschockproteine und Keratine. Eine Regulation zwischen den Zeitpunkten wurde kaum beschrieben und die Verwendung von vollständige Embryonen erschwert die Analyse herzspezifischer Faktoren.

In der zweiten Studie erfolgte die Analyse anhand der Zeitpunkte 72 und 120 hpf (Lucitt et al., 2008). 1384 Proteine konnten mittels LC-MS/MS identifiziert werden, allerdings ohne Quantifizierung. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese und massenspektrometrischer Analyse (MALDI-TOF/TOF) erfolgte die Identifikation von 789 Proteine, deren Expression zwischen den Zeitpunkten verglichen wurde. Proteine der Energieproduktion, der Entwicklung

sowie der Transkription und Translation zeigten zum Zeitpunkt 72 hpf eine höhere Expression. Strukturelle Proteine waren dagegen bei 120 hpf spezifisch reguliert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass zum Zeitpunkt 72 hpf eine höhere Syntheserate zellulärer Proteine vorliegt. Die Autoren schlussfolgern, dass während der Entwicklung zwischen 72 und 120 hpf eine Reifung der Organanlagen stattfindet. Diese Schlussfolgerung ist mit der vorliegenden Studie aus Kapitel 3.3 vergleichbar. Zum früheren Zeitpunkt konnte ebenfalls eine Anreicherung von Proteinen der Transkription, der Translation und der embryonalen Entwicklung dokumentiert werden. Zum Zeitpunkt 120 hpf liegen vor allem strukturelle und Calcium-bindende Proteine vor. Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Studien besteht darin, dass Lucitt et al. (2008) die Proteinexpression vollständiger Embryonen untersucht haben. Eine Betrachtung der Herzentwicklung ist daher nicht möglich. Ein Vorteil der SILAC-basierenden Studie liegt in der Größe des Datensatzes, mit dem eine Quantifizierung von 1398 Proteinen möglich war, die aus isolierten, embryonalen Herzen detektiert werden konnten.

Zusammenfassend gilt zu bemerken, dass die vorliegende quantitative Proteomstudie auf Grund der 1398 quantifizierten Proteinen die bisher umfangreichste Studie zur embryonalen Herzentwicklung in Zebrafischen ist. Basierend auf dem SILAC-Zebrafisch erfolgte die globale Proteinquantifizierung mit einer hohen Präzision und erstmals anhand von isolierten Herzen, wodurch die Entwicklungsprozesse zwischen 72 und 120 hpf umfassend beschrieben werden konnten.

4.4. Quantitative Proteomstudie des Morpholino-basierenden ALCAM-*knockdowns* in Zebrafischen

Im folgenden Abschnitt wurde nun der SILAC-Zebrafisch für eine globale, quantitative Proteinstudie angewendet, um Zebrafische zu charakterisieren, bei denen das *activated leukocyte cell adhesion molecule* (ALCAM) durch einen Morpholino-basierenden *knockdown* inaktiviert wurde.

4.4.1. Der Morpholino-basierende *knockdown* von ALCAM erfolgt ohne unspezifische Nebeneffekte

Ein weiterer Vorteil der Zebrafische liegt in der Anwendung von Morpholino (MO)-basierenden *knockdowns*. Ein MO bindet dabei spezifisch an eine mRNA und führt zur verringerten Expression des entsprechenden Proteins. Auf Grund der Injektion der Morpholinos in Oozyten ist die Durchführung einfach und kann für jedes Protein angewendet werden, wenn die Sequenz der entsprechenden mRNA bekannt ist. Infolge der effektiven Translationsinhibierung kann der resultierende Phänotyp auf die Funktion des Proteins untersucht werden. Auf Grund der Injektion in Oozyten im Ein- bis Zweizellstadium, verteilen sich die Morpholinos in den ersten Tagen der Entwicklung einheitlich in den Blastomeren und im gesamten Embryo. In dieser Zeit finden die kritischen Prozesse der Vertebratenentwicklung wie Somitogenese und Organogenese im Zebrafischembryo statt (Nasevicius und Ekker, 2000).

Nach der Injektion bleibt die Effizienz des MO in den ersten 50 hpf konstant hoch (Bedell et al., 2011). Anschließend dünnt sich der Morpholino langsam aus, wodurch die Effizienz sinkt. Diese Abnahme ist aber sequenzspezifisch und daher für jeden MO individuell. Die Analyse der Morphanten erfolgt in den ersten Tagen nach der Injektion, wenn der Phänotyp einheitlich und stark ausgeprägt ist. Phänotypen der embryonalen Entwicklung werden vor allem zu frühen Zeitpunkten studiert. Ein Problem bei der Analyse früher Entwicklungsprozesse ist die geringe Probenmenge auf Grund der geringen Größe der Embryonen. Dieser Effekt wird verstärkt, wenn einzelne Organe wie das Herz oder das Gehirn analysiert werden sollen. In der vorliegenden Arbeit konnte nun belegt werden, dass ausgehend von einer Probenmenge von etwa 10 μg an Protein resultierend aus isolierten Herzen positiver Morphanten eine globale SILAC-Proteinstudie möglich ist.

Wie bereits beschrieben, basiert die Methode des Morpholino-basierenden *knockdowns* auf der Bindung an eine spezifische mRNA, um die Translation oder das Spleißen des entsprechenden Proteins zu blockieren. Allerdings kann die Injektion eines Morpholinos auch zu unspezifischen Nebeneffekten führen, die nicht mit dem gezielten *knockdown* assoziiert sind (Bedell et al., 2011). Der molekulare Ursprung dieser Effekte konnte bisher nicht geklärt werden. Ein häufig dokumentierter, toxischer Phänotyp infolge einer MO-Injektion zeichnet sich durch die starke Deformation des Embryos aus, der häufig als Monster-

Phänotyp bezeichnet wird. Charakteristisch hierfür ist ein verkürzter Rumpf, ein stark gekrümmter Körper sowie ein kleiner Kopf und kleine Augen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein MO spezifisch gegen ALCAM injiziert. Der resultierende Phänotyp zeigte keine drastischen Veränderungen oder Deformationen wie eine starke Körperkrümmung (Abbildung 24). Die ALCAM-Morphanten zeichneten sich durch einen spezifischen Phänotyp des Herzens sowie durch eine fehlerhafte Entwicklung der Augen (Diekmann und Stuermer, 2009) und der Schwimmblase (Choudhry et al., 2011) aus.

Neben dem drastischen Monster-Phänotyp werden in 15 - 20% aller MO-Experimente auch neuronale Defekte als unspezifische Nebeneffekt beobachtet (Eisen und Smith, 2008). Einige Morpholinos führen zur Aktivierung von p53, wodurch eine p53-induzierte Apoptose in neuronalen Zellen einsetzt. Die Ursache dieser Interaktion ist allerdings unklar. In den Daten des vorliegenden ALCAM-Experiments zeigen Apoptose-assoziierte Proteine wie Asc1 und Caspase 3 keine Regulation in den Kontroll- und ALCAM-Morphanten. Daher kann ein unspezifischer Apoptose-Effekt für die detektierten Proteine ausgeschlossen werden. Um weitere Nebeneffekte zu dokumentieren, wird die Verwendung eines Kontroll-Morpholinos empfohlen, der infolge einer zufälligen Sequenz an keine mRNA binden sollte (Eisen und Smith, 2008). Zwischen nicht-injizierten Embryonen und Kontroll-Morphanten konnten nur 1,3% der Proteine mit einer Regulation von mehr als zweifach detektiert werden (Abbildung 25B). Die Korrelation zwischen beiden Datensätzen liegt bei 0,8. Daher fällt der Effekt des Kontroll-MO nur minimal aus, die Differenzen zwischen Wildtyp-Embryonen und Kontroll-Morphanten sind vergleichbar mit denen zwischen biologischen Duplikaten. Starke Nebeneffekte der Injektion konnten nicht dokumentiert werden. Um dennoch eine unspezifische Regulation von Proteinen im Datensatz der ALCAM-Morphanten auszuschließen, wurden die Proteine, die eine mindestens zweifache Regulation sowohl in den Kontroll- als auch in den ALCAM-Morphanten aufwiesen, in der Analyse der ALCAM-Morphanten nicht berücksichtigt. Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von 7 Proteinen, die z.B. das Dottersackprotein *Vtg3 protein* und das am Vesikeltransport beteiligte Protein *Coatomer protein complex, subunit zeta 1* enthält. Eine unspezifische Expression dieser Proteine auf Grund einer Morpholino-Injektion konnte bisher aber nicht beschrieben werden.

Um die Effizienz des Morpholino-basierenden ALCAM-*knockdowns* zu kontrollieren, erfolgten Antikörperfärbungen gegen ALCAM sowie die massenspektrometrische Quantifi-

zierung mittels SILAC. Anhand der Färbungen konnte bestätigt werden, dass in ALCAM-Morphanten die Expression von ALCAM im Herzen und in neuronalen Zellen stark verringert vorliegt (Abbildung 24). Mit Hilfe der quantitativen MS-Analyse basierend auf 5 Peptiden wurde anschließend belegt, dass die Expression von ALCAM um die fünffache Menge reduziert vorliegt. Es ist wichtig, die Effizienz des MO-*knockdowns* zu überprüfen, da anhand der Sequenz keine Aussagen über die Effektivität getroffen werden können (Eisen und Smith, 2008). Für Proteine, die nicht über spezifische Antikörper detektiert werden können, ist die SILAC-Technik die einzige Methode, um eine Proteinquantifizierung darzustellen.

4.4.2. Der Verlust von ALCAM führt zu einer defekten Differenzierung neuronaler Zellen in der Retina

Nach der Validierung der Effizienz des Morpholino-basierenden *knockdowns* von ALCAM sowie der Untersuchung von unspezifischen Nebeneffekten basierend auf der MO-Injektion durch einen Kontroll-Morpholino, wurde nun eine quantitative Proteomstudie mit den ALCAM-Morphanten durchgeführt. Das Proteom der vollständigen Embryonen wurde mit Hilfe der FASP-Methode enzymatisch verdaut und die resultierenden Peptide mittels isoelektrischer Fokussierung aufgetrennt, um die Komplexität des Proteoms zu reduzieren. Für die Analyse wurden jeweils 10 Embryonen nicht-injizierter Wildtypen und ALCAM-Morphanten vereinigt, um eine große Probenmenge zu erhalten sowie um biologische Variationen der einzelnen Individuen zu minimieren und den einheitlichen Effekt des ALCAM-*knockdowns* zu dokumentieren.

Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben wurde, konnte anhand der quantitativen Proteomstudie nur ein geringer Unterschied zwischen nicht-injizierten Embryonen und ALCAM-Morphanten dokumentiert werden. Lediglich 2% der quantifizierten Proteine wiesen eine Regulation von mindestens zweifach auf. Die Korrelation der Datensätze beträgt 0,7. Daher ist die Differenz zwischen Wildtypen und ALCAM-Morphanten kaum größer als die Expressionsunterschiede zwischen Wildtypen und Kontroll-Morphanten. Allerdings konnte die verringerte Expression von ALCAM in den Morphanten eindeutig gezeigt werden. Neben ALCAM zeigte eine Gruppe augenspezifischer Proteine eine starke Regulation in den Morphanten (Abbildung 25C). Dabei handelte es sich um die Proteine *Arrestin 3* (*arr3l*),

Retinal pigment epithelium-specific protein 65a (rpe65a), *Recoverin* (Zgc:114180) und *CrySTALLIN, beta A2a* (cryba2a). Von ALCAM ist bisher bekannt, dass es in differenzierenden und wachsenden Axonen der Nervenzellen exprimiert wird sowie eine Rolle in der Entwicklung von Motorneuronen und Axonen der retinalen Ganglienzellen (*retinal ganglion cell*, RGC) spielt. In der Studie von Diekmann und Stuermer (2009) wurde ein Morpholino-basierender *knockdown* in Zebrafischen induziert, um die Entwicklung der Netzhaut zu studieren. Es konnte ein spezifischer Augenphänotyp dokumentiert werden. Die Anzahl der RGC lag in den Morphanten stark verringert vor. Des Weiteren fand die terminale Differenzierung der RGC, sowie anderer Neuronen der Netzhaut wie die Photorezeptoren nicht statt. Die Netzhaut der Morphanten zeichnete sich durch einen Verlust von Axonen und optischer Nerven aus und blieb z.T. funktionslos. Die Autoren stellten die Vermutung auf, dass ALCAM den Zell-Zellkontakt während der Differenzierung der Netzhaut gewährleistet. In einer weiteren Studie führt der *knockout* von ALCAM in Mäusen zu einem vergleichbaren Phänotyp. Die ALCAM^{-/-}-Mutanten (in der Veröffentlichung als BEN^{-/-}-Mutanten (*bursal epithelium and neurons*) bezeichnet entsprechend der ersten Erwähnung des Proteins in Hühnern) zeichneten sich durch eine Netzhautdysplasie und Defaszikulation der Axone der RGC in der Netzhaut aus (Weiner et al., 2004). Die Axone der RGC verlieren dabei den Kontakt zueinander und liegen nicht mehr gebündelt vor, wodurch Defekte während der Entwicklung und Differenzierung der Netzhaut auftreten.

Anhand der beschriebenen Veröffentlichungen und der vorliegenden Arbeit kann zusammengefasst werden, dass ein Verlust von ALCAM zu einer defekten Entwicklung der Axone von RGC und anderer neuronaler Zellen in der Netzhaut führt. Der Defekt beruht wahrscheinlich auf dem fehlenden Kontakt der Axone und neuronaler Zellen. ALCAM scheint als Adhäsionsprotein diesen Zell-Zellkontakt zu gewährleisten. Allerdings konnte der Herzphänotyp der ALCAM-Morphanten anhand der Studie vollständiger Embryonen nicht näher beschrieben werden. Die Expression von herzspezifischen Proteinen scheint von dem Proteom der Skelettmuskulatur überlagert zu werden. Dagegen sind die Proteine der Netzhaut sehr spezifisch und können auch auf Grund der Größe der Augen im Verhältnis zum gesamten Embryo leicht detektiert werden. Um eine fokussierte Analyse des Herzphänotyps zu erreichen, erfolgte die Isolierung embryonaler Herzen aus ALCAM-Morphanten, um Hinweise auf die defekte Herzentwicklung zu erhalten.

4.4.3. Korrelation zwischen Transkriptom- und Proteomdaten der ALCAM-Morphanten

Basierend auf dem zentralen Grundprinzip der Molekularbiologie werden Gene in Transkripte (mRNA) umgeschrieben, die wiederum zu Proteinen translatiert werden. Dieser Prozess basiert jedoch nicht auf einem 1:1-Verhältnis. Ausgehend von einem Gen wird nicht ein Transkript geschrieben, welches nur für ein Protein kodiert. In einer Zelle erfolgen viele Regulationsprozesse sowie post-transkriptionalen und post-translationalen Modifikationen. Daher ist nicht bekannt, wie hoch die tatsächliche Korrelation zwischen Transkript- und Proteinmenge ist (Cox und Mann, 2011). Des Weiteren spielt der Zell- und Gewebetyp eine entscheidende Rolle und beeinflusst die Korrelation.

Um die quantitativen Proteindaten mit Transkriptdaten zu vergleichen, erfolgte eine Genexpressionsanalyse der ALCAM-Morphanten. Wie in der Studie von Diekmann und Stuermer (2009) konnte auch in der vorliegenden Arbeit der Augenphänotyp der ALCAM-Morphanten auf Transkriptebene beschrieben werden. Gene, die für Photorezeptoren und für Proteine der Phototransduktion kodieren, konnten in den Morphanten als signifikant herunterreguliert detektiert werden (Abbildung 26). Interessanterweise wurden Transkriptionsfaktoren der Augen- und Netzhautentwicklung sowie viele Kristalline der Linse als signifikant hochreguliert identifiziert. Wie bei Diekmann und Stuermer (2009) beschreiben wurde, kann die erhöhte Expression von Transkriptionsfaktoren an der unvollständigen Differenzierung der RGC liegen. Einige dieser Zellen befinden sich in den ALCAM-Morphanten auch zum Zeitpunkt 72 hpf noch in der Differenzierung.

Die Proteomanalysen der ALCAM-Morphanten wurden mit Genexpressionsanalysen in den Kapiteln 3.4.2 und 3.4.3 verglichen. In beiden Ansätzen konnte nur eine geringe Pearson-Korrelation bestimmt werden. Im Falle der vollständigen Embryonen betrug die Pearson-Korrelation zwischen Proteom- und Transkriptomdatensatz 0,12 (Abbildung 26B). Werden nur die regulierten Kandidaten berücksichtigt, steigt die Korrelation auf 0,25. Der Vergleich der Datensätze basierend auf isolierten Herzen erzielte nur eine Pearson-Korrelation von 0,09.

Aus bisher veröffentlichten Studien ist zu erkennen, dass die Korrelation zwischen der Protein- und der Transkriptmenge deutlich vom experimentellen Ansatz abhängig ist. Generell ist die mRNA- und Proteinebene unter konstanten Bedingungen gut vergleichbar,

wenn keine transgenen oder induzierten (z.B. Morpholino-Injektion, toxische Behandlungen) Modifikationen untersucht werden sollen. Weiterhin ist eine geringe Korrelation häufig die Folge von Variationen in der experimentellen Durchführung oder von limitierenden Datenmengen. Proben für Protein- und Transkriptomstudien resultieren häufig aus unterschiedlichen Experimenten. Dadurch entstehen experimentelle Unterschiede, die sich in den Ergebnisse niederschlagen. In der Studie von Schwanhausser et al. (2011) wurden die Protein- und mRNA-Mengen in der Zelllinie NIH3T3 (Mausfibroblasten) verglichen. Die Korrelation wurde mit 0,41 bestimmt. Eine weitere Studie, die in umfassendem Maße diploide und haploide Hefezellen mittels SILAC-Markierung verglich, beschrieb eine Korrelation zwischen Protein- und Transkriptdaten von 0,24 (de Godoy et al., 2008). In der Veröffentlichung von Bonaldi et al. (2008) wurde eine SILAC-markierte Zelllinie von *D. melanogaster* verwendet. Die Korrelation zwischen Protein- und Transkriptdaten betrug 0,38. Alle erwähnten Studien konnten mehrere tausend Proteine quantifizieren und für den Vergleich mit den Transkriptdaten verwenden. Eine zu geringe Datenmenge kann daher nicht der Grund für die geringen Korrelationen sein. Vermutlich beruht die Korrelation zwischen Protein- und Transkriptdaten u.a. auf der verwendeten Zellart bzw. auf dem Gewebe, auf der experimentellen Durchführung und dem biologischen Hintergrund der Studie. In der Veröffentlichung von Drexler et al. (2011) aus unserer Arbeitsgruppe wurden schnell (*Extensor Digitorum Longus*, EDL) und langsam (*Soleus*) kontrahierende Muskelfasern verglichen. Dafür wurden beide Muskeln aus Wildtyp-Mäusen entnommen und für die SILAC-Proteom- und Microarraystudie verwendet. Die dabei ermittelte Korrelation betrug 0,8. In diesem Ansatz beruht die hohe Korrelation wahrscheinlich auf dem stabilen System der Studie, da das zu untersuchende Gewebe von Wildtyp-Mäusen ohne transgenen Hintergrund oder experimenteller/toxischer Behandlung stammte und das gleiche Probenmaterial für die Proteom- und Transkriptomanalysen verwendet wurde.

Die Vorteile der Zebrafische als Modellorganismus wurden bereits ausführlich beschrieben (Kapitel 1.3 und 4.2.1). Allerdings ist die Zuordnung von annotierten Genen zu höheren Vertebraten wie der Maus oder dem Menschen in den Zebrafisch-Datenbanken (z.B. IPI-Datenbank, *International Protein Index*) bisher noch sehr lückenhaft. Demzufolge können Ungenauigkeiten bei der Zuordnung der RefSeq-IDs erfolgen, anhand derer der Vergleich zwischen Protein- und Transkriptdaten erfolgte. Des Weiteren erzielt der Affymetrix-Microarray (*GeneChip Zebrafish Genome Array*) nur eine recht geringere Abdeckung des Zebrafischgenoms. In der Studie der vollständigen ALCAM-Morphanten konnten nur zu

59% der quantifizierten Proteine die entsprechenden Transkripte auf dem Chip detektiert werden. Diese Ungenauigkeiten könnten zu der geringen Korrelation zwischen den Protein- und Transkriptdaten beigetragen haben. Ein weiterer Grund könnte im experimentellen Ansatz der Studie liegen, da Morpholino-injizierte Embryonen analysiert wurden. Jede Oozyte wurde einzeln injiziert, wobei minimale Variationen in der Menge des injizierten Morpholinos nicht ausbleiben. Anschließend wurden die Morphanten anhand des Phänotyps selektiert und vereinigt. Die Analyse einer Mischung von mehreren Morphanten ist allerdings von Vorteil, weil die biologische Variabilität der Individuen reduziert und der einheitliche ALCAM-spezifische Effekt dokumentiert werden kann. Eine weitere Variable in der experimentellen Durchführung liegt in der Isolierung von embryonalen Herzen. Auf Grund der geringen Probenmenge wurden mehrere Isolierungen verschiedener Tage vereinigt. Dennoch konnte bewiesen werden, dass mit Hilfe beider Studien der Herzphänotyp der ALCAM-Morphanten ausführlich beschrieben werden konnte. Vor allem durch die quantitative Proteomstudie basierend auf dem SILAC-Zebrafisch war es möglich, Kandidaten zu identifizieren, die auf dem Chip nicht verfügbar waren.

4.4.4. ALCAM reguliert die frühe Herzmorphogenese

Um den Herzphänotyp der ALCAM-Morphanten zu charakterisieren, wurden embryonale Herzen von Morphanten und von nicht-injizierten Embryonen isoliert und für eine quantitative Proteomstudie basierend auf dem SILAC-Zebrafisch sowie für eine Genexpressionsanalyse verwendet. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 27 und 28 zusammengefasst. In den Herzen der Morphanten konnten Proteine wie *Paralemmin* (PALM), *Integrin beta* (*itgb1b*), *Carbonic anhydrase* (*cahz*), das *Gapdhs protein* (*gapdhs*), *Cardiac myosin light chain-1* und das *Ras-like protein Rac1a* als herunterreguliert identifiziert werden. Hochregulierte Kandidaten sind vor allem strukturelle Proteine der Muskulatur und des Cytoskeletts wie *Tropomyosin 4* und *2* (*tpm4*, *tpm2*), *Muscle cofilin 2* (*cff2l*), *Cardiac troponin T* (*tnnt2a*), verschiedene Myosine (*mylz2*, *myl10*) und *Annexin A2a* (*anxa2a*).

Wie bereits im Kapitel 4.4.2 beschrieben wurde, ist ALCAM an der Entwicklung neuronaler Zellen involviert und scheint als Vermittler von Zell-Zellkontakten zwischen den Axonen neuronaler Zellen wie den RGC in der Netzhaut zu agieren. Über den Einfluss von ALCAM auf die Herzentwicklung ist allerdings nicht viel bekannt. In der Studie von Gessert

et al. (2008) wurde eine defekte Herzmorphogenese im Krallenfrosch nach dem *knockdown* von ALCAM beschreiben. Nach der Initiation des *Looping*-Prozesses im Herzschauch erfolgte die frühzeitige Beendigung der Herzentwicklung. Des Weiteren wurde ein sehr dickes, aber lückenhaftes Myokard beschrieben, dessen Zellen eine lose organisierte Gewebestruktur aufwiesen. Der Verlust von ALCAM führte daher zu einer reduzierten Zelladhäsion im Herzmuskel. Weiterhin konnten für einige Gene (u.a. Tbx20 und Tnni3), die charakteristisch sind für die Entwicklung des Herzens, eine verringerte Expression beschrieben werden. Allerdings ist unklar, ob die defekte Herzmorphogenese nach der Initiation des *Looping*-Prozesses eine direkte Konsequenz des Fehlens von ALCAM ist oder ob die Defekte auf der reduzierten Expression einiger Markergene beruhen. Da die Entwicklung des Herzens im Frosch direkt nach dem *Looping*-Prozesses abbricht, könnte ein direkter Einfluss von ALCAM vorliegen. In Zebrafischen konnte gezeigt werden, dass beginnend mit dem *Looping*-Prozesses und der AV-Knotenbildung auch die Expression von ALCAM induziert wird (Beis et al., 2005). Zeitgleich erfolgt die Veränderung der Zellform in ALCAM-positiven Zellen des AV-Endokards. In der vorliegenden Arbeit konnte in ALCAM-Morphanten ein ähnlicher *Looping*-Defekt wie im Krallenfrosch detektiert werden sowie die langgestreckten Herzkompimente (Atrium und Ventrikel).

Bei dem Protein ALCAM handelt es sich um ein Transmembranprotein mit einer großen, extrazellulären Domäne, auf Grund derer u.a. ALCAM-ALCAM-Interaktionen und daher Zell-Zellkontakte aufgebaut werden. Es konnte beschrieben werden, dass ALCAM intrazellulär mit dem Aktincytoskelett interagiert (Nelissen et al., 2000). Um ALCAM-ALCAM-Interaktionen und somit Zellkontakte zu ermöglichen, muss eine strukturelle Veränderung im Aktincytoskelett erfolgen, um ALCAM freizugeben. In Zimmerman et al. (2004) wurden potentielle Signalwege untersucht, die in dieser Regulation der ALCAM-basierenden Zelladhäsion involviert sind. Es ist bekannt, dass kleine GTPasen wie RhoA, Rac1 und Cdc42 an der Regulation des Aktincytoskeletts beteiligt sind. Des Weiteren spielen diese Proteine eine Rolle bei der Zelladhäsion, die vermittelt wird durch Integrine, Cadherine und Ig-CAMs. Zu der Proteinfamilie der Ig-CAMs ist auch ALCAM zugehörig. Allerdings konnte kein direkter Einfluss der GTPasen auf die ALCAM-basierende Zelladhäsion gezeigt werden. Ein weiterer Kandidat war die Protein Kinase C (PKC), die eine Rolle bei der Umgestaltung des Cytoskeletts spielt. In der Studie konnte gezeigt werden, dass die Isoform PKC α an der Freigabe von ALCAM vom Aktincytoskeletts beteiligt ist. Allerdings konnte keine direkte Interaktion zwischen PKC α und der intrazellulären Domäne von AL-

CAM beschrieben werden. Des Weiteren fehlen entsprechende Phosphorylierungsstellen an der Domäne. Die Autoren vermuten, dass an der ALCAM-basierende Zelladhäsion infolge der Aktivierung von PKC α weitere Komponenten des Cytoskeletts beteiligt sind.

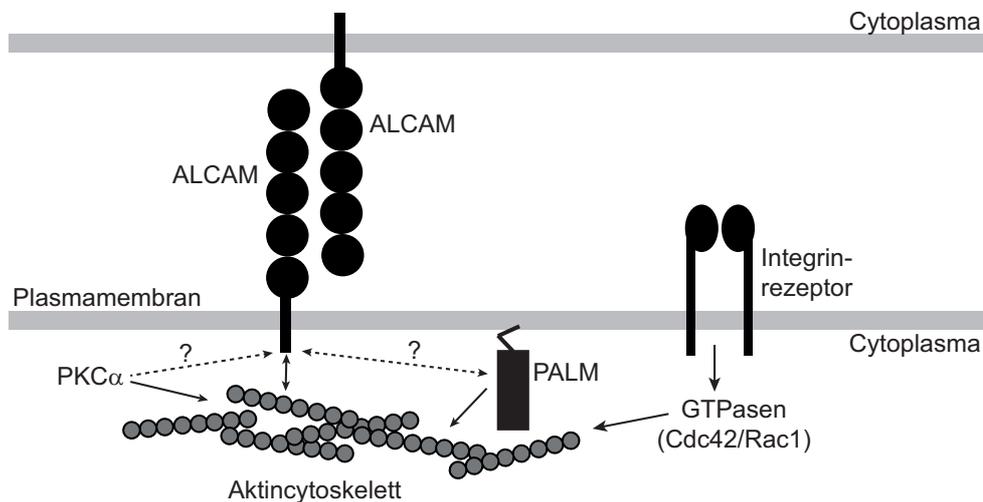


Abbildung 36.: Modell zur Funktion von ALCAM. Als Transmembranprotein spielt ALCAM eine Rolle bei der Zelladhäsion. Erst nach der Freigabe der cytoplasmatischen Domäne vom Cytoskelett erfolgen ALCAM-ALCAM-Interaktion, welche die Zellkontakte ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass PKC alpha an der Freigabe von ALCAM vom Aktincytoskelett beteiligt ist, allerdings konnte keine direkte Interaktion mit ALCAM nachgewiesen werden. GTPasen wie Rac1 sind zwar an der Regulation des Aktincytoskeletts sowie an der Zelladhäsion durch Integrinrezeptoren beteiligt, besitzen aber keinen Einfluss auf die ALCAM-basierende Zelladhäsion. Paralemmen (PALM) ist ein Adapterprotein, das u.a. Membranproteine mit dem Cytoskelett verbindet und die Zellform reguliert. Eine Beteiligung an der Interaktion zwischen ALCAM und dem Aktincytoskelett wäre daher denkbar. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch den knockdown von ALCAM die Expression vom Integrinrezeptor (*itgb1b*), der GTPase Ras-like protein *Rac1a* und Paralemmen reduziert ist. Die daraus resultierende, fehlerhafte Regulation der Zellform und Zellkontakte könnte daher zu der unvollständigen Herzentwicklung führen.

In der vorliegenden Studie konnte in den Herzen der ALCAM-Morphanten eine um 5,5-fach verringerte Expression von Paralemmen (PALM) detektiert werden, welche immunohistochemisch bestätigt werden konnte (Abbildung 29). Weiterhin konnte dieses Protein mit einer 1,5-fach verringerten Expression in den Proteomdaten vollständiger Embryonen identifiziert werden. Bei Paralemmen handelt es sich um ein Phosphoprotein, dass mit der

cytoplasmatischen Seite der Zellmembran verankert ist (Kutzleb et al., 2007). Vergleichbar mit ALCAM wird Paralemmen in verschiedenen Geweben exprimiert, vor allem aber in neuronalen Zellen. Paralemmen spielt eine wichtige Rolle bei der Organisation der Zellarchitektur und bei der Aufrechterhaltung der Zellform. Funktionell scheint Paralemmen als Adapterprotein zu dienen, um Membranproteine mit anderen Proteinen oder mit dem Cytoskelett zu verbinden. Es liegt daher nahe, dass Paralemmen auch an der Interaktion von ALCAM und dem Cytoskelett beteiligt ist. Es könnte nach der Aktivierung von PKC α eine Modellierung im Aktincytoskelett induzieren, um ALCAM zu lösen und somit die Zelladhäsion zu ermöglichen. Des Weiteren könnte Paralemmen während der Herzentwicklung an der Veränderung der Zellform während der AV-Knotenbildung beteiligt sein. Beis et al. (2005) konnten dokumentieren, dass mit der Expression von ALCAM eine Veränderung der Zellform einhergeht, die für die Morphogenese des Herzens relevant ist. Wahrscheinlich findet für die Kontrolle der Zellform und für die Koordination der Zell-Zellkontakte ein komplexes Zusammenspiel von Transmembranproteinen wie ALCAM und Integrinrezeptoren, von Adapter- und Signalproteinen wie Paralemmen und GTPasen sowie dem Cytoskelett statt (Abbildung 36). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach dem *knockdown* von ALCAM auch die Expression vom Integrinrezeptor (*itgb1b*), der GTPase *Ras-like protein Rac1a* und Paralemmen verringert vorliegen. Für die GTPase RhoA konnte im Herzen keine Regulation detektiert und Cdc42 sowie die Protein Kinase C konnten in den SILAC-Daten nicht identifiziert werden. Um detaillierte Aussagen über die Funktionsweise von ALCAM und über das Zusammenspiel mit den erwähnten Proteinen treffen zu können, sollten entsprechende Experimente und Studien folgen.

4.5. Maus-Kardiomyozyten zeigen minimale Adaptionen während der Alterung

Im letzten Kapitel soll nun die Alterungsstudie von Maus-Kardiomyozyten diskutiert werden. Mit Hilfe der SILAC-basierenden quantitativen Proteomanalyse wurden isolierte Kardiomyozyten von gealterten Mäusen analysiert. Wie im Kapitel 3.5 beschrieben wurde, erfolgte die Studie anhand isolierter Kardiomyozyten aus Mäusen in einem Alter von 2, 22 und 30 Monaten. Als interner Standard für die Proteinquantifizierung wurden Lysin-6-markierte Kardiomyozyten der SILAC-Maus verwendet. Der Vergleich des Proteoms von

Herzmuskelzellen aus Mäusen in einem Alter von 2 und 22 Monaten führte nur zur Detektion von 5 ($\cong 0,2\%$) signifikant und mindestens zweifach regulierten Proteine (Abbildung 32). Daher wurde die Alterungsstudie mit Kardiomyozyten aus Mäusen in einem Alter von 30 Monaten wiederholt, um altersspezifische Anpassungen der Zellen zu dokumentieren. Es konnten 10 ($\cong 0,6\%$) der quantifizierten Proteine als signifikant und mindestens zweifach reguliert detektiert werden (Abbildung 34), wie z.B. das *Mitochondrial uncoupling protein 3* (UCP3) und das *Four and a half LIM domains protein 2* (Fhl2) als herunterregulierte Kandidaten sowie das *Myosin heavy chain 7* (Myh7) und die *3-hydroxybutyrate dehydrogenase* (BDH1) als hochregulierte Proteine.

In einer ähnlichen SILAC-basierenden Studie wurden altersspezifische Effekte im Proteom des frontalen Kortex und des Hippocampus untersucht (Walther und Mann, 2011). Dabei wurden Mäuse in einem Alter von 5 und 26 Monaten verglichen. Als interner Proteinstandard wurde ebenfalls Gewebe der SILAC-Maus verwendet. Es konnten 4200 Proteine aus beiden Regionen des Gehirns quantifiziert werden, wobei weniger als 1% der Proteine mehr als zweifach zwischen den jungen und gealterten Proben reguliert waren und nur 5 Kandidaten ($\cong 0,1\%$) eine signifikante Regulation zeigten. Neben dem Gehirn wurde auch Herzgewebe analysiert, welches ebenfalls nur minimale, altersbedingte Veränderungen zeigte. Es konnten 2626 Proteine in den Herzproben quantifiziert werden, von denen 1,5% mit einer mindestens zweifachen Regulation detektiert wurden. Zwei Kandidaten aus der vorliegenden Studie konnten in der Analyse von Walther und Mann (2011) mit einer mindestens zweifach stärkeren Expression in gealterten Herzen bestätigt werden: BDH1 und das *Myosin heavy chain 7* konnten mit einer Expression von 1,1 und 1,7 (\log_2) detektiert werden. Die anderen Kandidaten, die in den gealterten Kardiomyozyten von 30 Monaten eine signifikante Regulation von mindestens 1,5-fach aufwiesen, wurden in der Vergleichsstudie ohne altersbedingte Expression detektiert, wobei vier Proteine wie UCP3 nicht identifiziert werden konnten. Obwohl die vergleichende Analyse der beiden Datensätze nur eine sehr geringe Übereinstimmung in der Gruppe der regulierten Proteine ergab, konnten zwei Kandidaten (BDH1 und Myh7) als hochregulierte Proteine in beiden Datensätzen detektiert werden.

Eine weitere Studie über die altersspezifisch veränderte Proteinexpression im Herzen erfolgte mit Mäusen in einem Alter von 5 und 24 Monaten, allerdings mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese (Chakravarti et al., 2008). Fast alle der regulierten Proteine konnten

auch in dem Datensatz der vorliegenden Studie quantifiziert werden, jedoch ohne eine Regulation in den Kardiomyozyten zwischen 2 und 30 Monaten zu zeigen. Des Weiteren sind mehrere Genexpressionsanalysen basierend auf Microarrays veröffentlicht worden, die altersbedingte Veränderungen im Herzen dokumentieren. Ein Vergleich dieser Studien zeigt aber, dass signifikant regulierte Kandidaten nicht immer bestätigt werden konnten. In den Studien von Lee et al. (2002) und Park et al. (2008) wurden die Transkriptmengen von Mausherzen nach 5 und 30 Monaten verglichen und ein altersbedingter Wechsel vom Fettsäure- zum Kohlenhydratstoffwechsel beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine leicht verringerte Expression von Kandidaten des Fettsäuremetabolismus wie der *Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4* (\log_2 FC: -1,1), der *Carnitine O-palmitoyltransferase 1a* und *2* (-0,83 und -0,45) in Kardiomyozyten nach 30 Monaten detektiert werden. Eine erhöhte Glykolyse konnte aber anhand der leicht reduzierten Expression der *Aldolase 1* (0,06), der *Hexokinase 1* (-0,22) und der *Phosphoglycerate kinase 1* (-0,30) nicht bestätigt werden. Des Weiteren wurde in den beiden Studien eine altersbedingte Reduktion der Proteinsynthese sowie eine erhöhte Expression von Strukturproteinen detektiert. Auch im vorliegenden Datensatz konnte eine leichte Reduktion in der Translation nach 30 Monaten identifiziert werden, allerdings konnte eine Zunahme in der Expression von strukturellen Proteinen nicht bestätigt werden, wie die Expression vom *alpha skeletal muscle Actin* (-0,73), *alpha cardiac Actin* (0,2), *Tropomyosin 3* (0,09) sowie vom *Ventricular myosin regulatory light chain* (0,22) zeigt. Auch in anderen Studien wurde bereits eine altersbedingte Abnahme von sarkomeren Proteinen wie dem *alpha cardiac Actin* beschrieben (Carrier et al., 1992; Bodyak et al., 2002).

Entsprechend zur vorliegenden Alterungsstudie erfolgte die Analyse von Bodyak et al. (2002) ebenfalls mit isolierten Kardiomyozyten, allerdings von Mäusen in einem Alter von 4 und 20 Monaten. Basierend auf dieser Microarray-Studie konnten 43 Kandidaten mit einer altersspezifischen Expression detektiert werden, eine Veränderung des Fettsäurestoffwechsels konnte aber nicht beschrieben werden. Neben der Reduktion von Strukturproteinen wurde eine verringerte Expression von Proteinen der zellulären Stressantwort sowie eine reduzierte mitochondriale Aktivität detektiert. Auch in der vorliegenden Studie konnten Proteine der oxidativen Stressantwort wie die Heat-shock Proteine Hsp24 (-0,59) und Hsc70 (-0,19) als leicht herunterreguliert identifiziert werden. Weiterhin waren auch Enzyme der mitochondrialen Atmungskette in Kardiomyozyten von 30 Monaten leicht herunterreguliert, was auf eine reduzierte Aktivitäten der Mitochondrien hinweist. Ein häufig

beschriebener Faktor der Alterung ist der oxidative Stress, der zur Schädigung von zellulären Strukturen auf Grund der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) führt (Bokov et al., 2004). Da ROS als Nebenprodukt der Atmungskette in den Mitochondrien gebildet werden, nehmen mit dem Alter die Schädigungen der mitochondrialen Proteine zu, was zu einer beeinträchtigten Funktion dieser Organellen führt (Lesnefsky et al., 2001). Rückwirkend nimmt die Bildung von ROS auf Grund der beeinträchtigten Atmungskette noch stärker zu, was zu einer zunehmenden Schädigung der Mitochondrien und anderer Zellstrukturen und letztlich zur Seneszenz der Kardiomyozyten führt. Die reduzierte oxidative Stressantwort sowie die beeinträchtigte Aktivität der Mitochondrien in den Kardiomyozyten in einem Alter von 30 Monaten weisen auf den eben beschriebenen Alterungsprozess hin. Allerdings sind die Regulationen der beteiligten Proteine z.T. sehr schwach und nicht signifikant, eine entsprechende Tendenz ist aber zu erkennen.

Des Weiteren konnte das *Mitochondrial uncoupling protein 3* (UCP3) in gealterten Kardiomyozyten als signifikant herunterreguliert detektiert werden (Abbildung 34). Für UCP3 wurde bereits eine reduzierte Expression im gealterten Skelettmuskel von Ratten beschrieben (Kerner et al., 2001) und ein Zusammenhang zwischen der Menge von ROS und UCP3 wurde vermutet (Brand et al., 2002). In der Studie von Nabben et al. (2008) konnte nun gezeigt werden, dass mit dem Alter die mitochondriale Bildung von ROS zunimmt und eine Überexpression von UCP3 diese altersbedingte Zunahme reduziert, wodurch zelluläre Schäden auf Grund von oxidativem Stress verringert wurden. UCP3 scheint daher eine Schutzfunktion für Mitochondrien gegenüber oxidativem Stress auszuüben, allerdings nimmt dieser Schutz mit dem Alter ab, was UCP3 zu einem wichtigen Faktor des Alterungsprozesses macht. Des Weiteren scheint UCP3 einen Einfluss auf den Fettsäurestoffwechsel zu nehmen, da die Überexpression von UCP3 mit einer erhöhten Expression von Proteinen des Fettsäuremetabolismus assoziiert ist (Bezaire et al., 2005). In der vorliegenden Studie konnte neben der signifikant reduzierten Expression von UCP3 auch eine leicht verringerte Expression von Proteinen dokumentiert werden, die am Fettsäurestoffwechsel beteiligt sind. Der Energiebedarf des Herzens wird zu 99% über den oxidativen Abbau energiereicher Substanzen wie freier Fettsäuren, Glucose, Lactat und Ketonkörper abgedeckt (Keul et al., 1965). Das Myokard scheint einen altersbedingten Wechsel im Energiemetabolismus zu durchlaufen, da eine verringerte Fettsäureoxidation sowie eine Zunahme in der Oxidation von Glucose in gealterten Herzen bereits mehrfach beschreiben wurde (Lee et al., 2002;

Kates et al., 2003; Hyyti et al., 2010).

Ein weiterer Aspekt der altersbedingten Anpassung von Kardiomyozyten ist der Ketonstoffwechsel. Durch die β -Oxidation von Fettsäuren erfolgt in der Leber die Bildung von Ketonkörpern (Acetacetat, β -Hydroxybutyrat und Aceton), die über das Blut zu verschiedenen Organen wie der Niere, dem Gehirn und dem Herz transportiert werden. In den Zielorganen werden die Ketonkörper zur Deckung des Energiebedarfs zu Acetyl-CoA verwertet und dem Citratzyklus zugeführt (Berg et al., 2003). Unter normalen physiologischen Bedingungen sind Ketonkörper aber nur sekundäre Energielieferanten, während im Hungerzustand oder bei *Diabetes mellitus* eine erhöhte Konzentration von Ketonkörpern im Blut vorliegt. In der vorliegenden Arbeit konnten Proteine des Ketonstoffwechsels in gealterten Kardiomyozyten als heraufreguliert detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde in Hyyti et al. (2010) beschrieben, dass in Herzen gealterter Mäuse sowohl eine reduzierte Fettsäureoxidation als auch eine Reduktion in der Oxidation von Ketonkörpern vorliegt. Allerdings zeigen die Ergebnisse dieser Studie einen konstanten Anteil von Acetacetat am Citratzyklus sowie vergleichbare Konzentrationen von β -Hydroxybutyrat im Blutplasma zwischen jungen und gealterten Mäusen. Um den Anteil von Ketonen und freien Fettsäuren am Citratzyklus zu messen, erfolgte die Studie mit isolierten Herzen, wodurch die Ergebnisse im Vergleich zur *in vivo* Situation in gealterten Mäusen leicht variieren könnten. In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Proteine des Ketonstoffwechsels in Kardiomyozyten von 22 Monaten sowie das BDH1 nach 30 Monaten mit einer signifikant erhöhten Expression detektiert. BDH1 ist an der Synthese sowie an der Verwertung von Ketonkörpern als Energiequelle beteiligt (Guder et al., 1983; Maurer et al., 2011), eine altersspezifische Expression konnte bisher aber nicht beschrieben werden. Des Weiteren konnte eine erhöhte Expression der mitochondrialen Proteine HMGCS2 (*Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase*) (\log_2 FC: 0,56) und HMGCL (*Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase*) (0,76) in gealterten Kardiomyozyten nach 22 Monaten detektiert werden. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Schlüsselenzyme der Ketonkörper-Synthese, die vor allem in den Mitochondrien der Leber vorkommen, deren Expression aber auch im Herzen nachgewiesen werden konnte (Puisac et al., 2012). Diese Ergebnisse weisen auf einen erhöhten Bedarf an Ketonkörpern in gealterten Herzen hin. Neben dem Aspekt der Energiezufuhr wurde für Acetacetat (Ketonkörper) auch eine Funktion als Antioxidanz zum Schutz vor oxidativem Stress im Herzen beschrieben (Squires et al., 2003). Für gealterte Kardiomyozyten, die einer erhöhten Bildung von ROS ausgesetzt sind, wäre ein zusätzlicher Schutz durch Acetacetat sinnvoll.

Zusammenfassend gilt zu bemerken, dass anhand der Alterungsstudie basierend auf der globalen SILAC-Proteinquantifizierung der reduzierte Fettsäurestoffwechsel sowie die beeinträchtigte zelluläre Antwort auf oxidativen Stress in Kardiomyozyten dokumentiert und bestätigt werden konnte. Zusätzlich wurde erstmals eine altersbedingt erhöhte Expression von Proteinen identifiziert, die am Ketonstoffwechsel beteiligt sind. Insgesamt fällt aber die altersbedingte Adaption der Kardiomyozyten gering aus, was auch schon bei Walther und Mann (2011) im Herzen und Gehirn gezeigt werden konnte. Wahrscheinlich erfolgt die zelluläre Anpassung während der Alterung sehr individuell. Weiterhin könnten Effekte der Seneszenz von Kardiomyozyten überlagert werden, die keine altersbedingten Veränderungen aufweisen. Wie in Kapitel 1.6 beschrieben wurde, erfolgt während der Alterung im Herzen eine Akkumulation seneszenten Vorläuferzellen und seneszenten Kardiomyozyten. Der Anteil dieser Zellen könnte im Vergleich zu gesunden Zellen noch zu gering sein, wodurch eine entsprechende Proteinexpression nicht detektiert werden kann. Ferner könnten altersspezifische Veränderungen im Herzen deutlicher in Zellen erfolgen, bei denen es sich nicht um Kardiomyozyten handelt. Zellen wie Fibroblasten, neuronale Zellen oder Epithelzellen wurden in der vorliegenden Studie nicht betrachtet, da die quantitative Proteomstudie mit isolierten Kardiomyozyten erfolgte. Eine altersbedingte Umstrukturierung der kardialen extrazellulären Matrix (EZM) in Form einer Fibrose führt häufig zu Herzfehlern im hohen Alter (Cieslik et al., 2011). Auf Grund der Betrachtung isolierter Kardiomyozyten konnten allerdings keine Aussagen über Veränderungen in den Proteinexpressionen der EZM getroffen werden.

5. Zusammenfassung

Neue Erkenntnisse über die physiologischen, molekularen und pathologischen Prozesse im Herzen konnten im letzten Jahrzehnt anhand von Modellorganismen gewonnen werden. Die Entwicklung neuer Techniken ermöglichte außerdem die Etablierung umfangreicher und eindrucksvoller Studien basierend auf den neuesten Mikroskopieverfahren, auf globalen Genexpressionsanalysen (Microarray) sowie auf modernen Massenspektrometrie (MS)-basierenden Proteinanalysen anhand von hochauflösenden Tandem-Massenspektrometern.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die quantitative Proteinanalyse des Herzens gelegt. Mit Hilfe der Massenspektrometrie und der SILAC-basierenden Proteinquantifizierung sollten herzspezifische Veränderungen während der embryonalen Entwicklung sowie während der Alterung analysiert werden. Um eine robuste und hochwertige Proteinquantifizierung im Zebrafisch (*Danio rerio*) zu ermöglichen, wurde der Modellorganismus nach der SILAC-Methode mit der Isotopen-gekoppelten Aminosäure Lysin-6 markiert. Für die vollständige Markierung des Zebrafisches wurde ein SILAC-Futter speziell für larvale und adulte Fische entwickelt, das Lysin-6-markierte Zellen von *Saccharomyce cerevisiae*, *Escherichia coli*, SILAC-Mausfutter sowie Gewebe der SILAC-Maus bzw. Lysin-6-markierte Larven von *Drosophila melanogaster* enthält. Die partielle (*pulse*) SILAC-Markierung der Fische konnte für globale Proteinstudien genutzt werden, um Markierungsraten in verschiedenen Organen und Regenerationsprozesse in der Schwanzflosse zu dokumentieren. Neben der allgemeinen Charakterisierung regenerativer Prozesse konnten Faktoren der Flossenregeneration wie Actinodin 2 und 4 identifiziert werden.

Die vollständige Markierung der Zebrafische wurde in der ersten Filialgeneration (F1) mit einer Lysin-6-Inkorporation von 95% in adulten Fischen erreicht. Anschließend konnte die hohe Präzision der Proteinquantifizierung basierend auf dem SILAC-Zebrafisch als internen Standard anhand von technischen und biologischen Triplikaten bestätigt werden.

Um die späte embryonale Herzentwicklung im Zebrafisch zu studieren, wurden embryonale Herzen zu den Zeitpunkten 72 und 120 hpf isoliert und mit SILAC-Embryonen als internem Proteinstandard gemischt. Anhand von 1398 Proteinen, die massenspektrometrische (LC-MS/MS) identifiziert wurden, konnte eine Anreicherung von Proteinen der DNA-Replikation und Translation zum frühen Zeitpunkt sowie eine Anreicherung von strukturellen Proteinen der Sarkomere und Calcium-bindenden Proteinen zum späten Zeitpunkt detektiert werden. Diese Ergebnisse beschreiben den Übergang von proliferierenden zu ausdifferenzierten Kardiomyozyten während der späten embryonalen Entwicklung. Um die Konsequenz eines entwicklungsbiologisch wichtigen Faktors bei der Herzentwicklung zu untersuchen, wurde die Expression des Proteins *activated leukocyte cell adhesion molecule* (ALCAM) durch eine Morpholino-Injektion im Zebrafisch inhibiert und der resultierende Phänotyp analysiert. Auf Protein- und Transkriptebene konnte eine reduzierte Expression augenspezifischer Proteine detektiert werden, die auf eine verzögerte Differenzierung neuronaler Zellen in der Retina hinweisen. Um den herzspezifischen Phänotyp zu charakterisieren, erfolgte die Analyse isolierter embryonaler Herzen aus ALCAM-Morphanten. Die reduzierte Expression von Proteinen der Zelladhäsion und der Organisation des Cytoskeletts wie Paralemin (PALM), dem Integrinrezeptor (*itgb1b*) und der GTPase *Ras-like protein Rac1a* konnte detektiert werden. Wahrscheinlich führt ein Funktionsverlust von ALCAM zu einer verminderten Kontrolle der Zellform sowie zu einer beeinträchtigten Koordination der Zell-Zellkontakte, da die komplexe Interaktion zwischen Transmembranproteinen, Adapterproteinen und dem Cytoskelett beeinflusst wird.

Neben den entwicklungsbiologischen Fragestellungen standen in der vorliegenden Arbeit auch die Analysen von altersbedingten Veränderungen der Herzfunktion im Vordergrund. Hierfür wurden Kardiomyozyten aus jungen (2 Monate) und gealterten (22 und 30 Monate) Mäusen isoliert und für eine quantitative Proteomanalyse basierend auf der SILAC-Maus eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass Maus-Kardiomyozyten während der Alterung minimale Adaptionen im Fettsäurestoffwechsel sowie eine beeinträchtigte zelluläre Antwort auf oxidativen Stress aufweisen. Zusätzlich wurde erstmals eine altersbedingt erhöhte Expression von Proteinen identifiziert (u.a. BDH1), die am Ketonstoffwechsel beteiligt sind. BDH1 katalysiert die Synthese des Ketonkörpers Acetacetat, für den bereits eine Funktion als Antioxidans beschrieben wurde. Daher könnte es sich hier um eine altersbedingte Schutzfunktion vor oxidativem Stress im Herzen handeln.

6. Summary

During the last decade we have gained insights into physiological, molecular and pathological processes of the heart based on the work with model organisms. In addition, the development of new techniques like high-end imaging systems, global gene expression analyses (Microarray) and state-of-the-art mass spectrometry (MS)-based protein analyses enabled comprehensive and impressive studies in this field.

This work focuses on quantitative proteome analyses of the heart. Heart-specific changes during embryonic development and during aging were analyzed by mass spectrometry and SILAC-based protein quantification. For this purpose, the zebrafish (*Danio rerio*) was SILAC-labeled with the heavy amino acid Lysin-6 to enable high quality protein quantification in this model organism. In order to label the zebrafish, a heavy diet was developed based on Lysin-6-labeled *Escherichia coli*, *Saccharomyce cerevisiae*, larvae of *Drosophila melanogaster*, SILAC mouse tissue and SILAC mouse diet. Unsaturated (pulse) SILAC-labeling was employed to determine protein incorporation rates in different tissues which allowed for characterization of the fin regeneration process as well as identification of newly synthesized proteins during fin regeneration (e.g. Actinodin 2 and 4).

Adult zebrafish of the F1 generation showed complete labeling with a Lysin-6 incorporation rate of 95%. Furthermore, the high accuracy of SILAC protein quantification in zebrafish could be demonstrated by technical and biological triplicates. To analyse the late embryonic heart development, embryos of the SILAC-zebrafish were used as an internal standard for protein quantification and mixed with non-labeled isolated embryonic hearts of 72 and 120 hpf. In total 1398 protein were quantified by mass spectrometry (LC-MS/MS) at both developmental stages. Proteins belonging to DNA replication and translation were enriched at the early time point, whereas structural proteins of the sarcomeres and calcium-binding proteins were over-represented at the later developmental stage.

These findings indicate strong differentiation of subcellular structures of cardiomyocytes during the late embryonic development. To evaluate an important factor during heart development, the adhesion protein ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) was knocked-down by Morpholino injection in zebrafish. Analysis of the resulting phenotype, both on protein and transcript level, revealed a down-regulation of several proteins located in the eye, suggesting a delayed development of the retina in ALCAM morphants. To focus on the heart specific phenotype, the analysis was repeated using isolated embryonic hearts of ALCAM morphants. Reduced expression levels of Paralemmmin (PALM), the Integrin receptor beta and the Ras-like protein Rac1a were observed, all of which are important regulators for cell adhesion and cytoskeletal reorganization. These results suggest that the depletion of ALCAM leads to reduced regulation of the cell shape and a disturbed crosstalk between transmembrane proteins, adhesion proteins and the cytoskeleton.

In addition to developmental analyses, this work focuses on heart specific changes during aging. For the quantitative proteome analysis, isolated cardiomyocytes of the SILAC mouse were used as an internal standard and mixed with non-labeled isolated cardiomyocytes of young (2 month) and aged (22 and 30 month) mice. The results revealed minor changes in fatty acid metabolism and an impaired cellular response to oxidative stress in cardiomyocytes during aging. In addition, we found an up-regulation of proteins belonging to the ketone body metabolism (e.g. BDH1) in aged hearts. BDH1 catalyse the synthesis of the ketone body acetoacetate, which is known to be an antioxidant, suggesting a function in protecting cardiomyocytes against oxidative stress during aging.

Literaturverzeichnis

- R. Aebersold und M. Mann. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928): 198–207, 2003.
- M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin, und G. Sherlock. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.*, 25(1):25–29, 2000.
- J. Bakkers. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc. Res.*, 91:279–288, 2011.
- D. Baycin-Hizal, Y. Tian, I. Akan, E. Jacobson, D. Clark, A. Wu, R. Jampol, K. Palter, M. Betenbaugh, und H. Zhang. GlycoFish: a database of zebrafish N-linked glycoproteins identified using SPEG method coupled with LC/MS. *Anal. Chem.*, 83(13):5296–5303, 2011.
- V. M. Bedell, S. E. Westcot, und S. C. Ekker. Lessons from morpholino-based screening in zebrafish. *Brief Funct Genomics*, 10:181–188, 2011.
- D. Beis, T. Bartman, S. W. Jin, I. C. Scott, L. A. D’Amico, E. A. Ober, H. Verkade, J. Frantsve, H. A. Field, A. Wehman, H. Baier, A. Tallafuss, L. Bally-Cuif, J. N. Chen, D. Y. Stainier, und B. Jungblut. Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development. *Development*, 132:4193–4204, 2005.
- A. P. Beltrami, K. Urbanek, J. Kajstura, S. M. Yan, N. Finato, R. Bussani, B. Nadal-Ginard, F. Silvestri, A. Leri, C. A. Beltrami, und P. Anversa. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, 344:1750–1757, 2001.

- A. P. Beltrami, L. Barlucchi, D. Torella, M. Baker, F. Limana, S. Chimenti, H. Kasahara, M. Rota, E. Musso, K. Urbanek, A. Leri, J. Kajstura, B. Nadal-Ginard, und P. Anversa. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114(6):763–776, 2003.
- M. J. Berg, J. L. Tymoczko, und L. Stryer. *Stryer Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 5th edition, 2003. ISBN 3827413036.
- O. Bergmann, R. D. Bhardwaj, S. Bernard, S. Zdunek, F. Barnabe-Heider, S. Walsh, J. Zupicich, K. Alkass, B. A. Buchholz, H. Druid, S. Jovinge, und J. Frisen. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 324(5923):98–102, 2009.
- V. Bezaire, L. L. Spriet, S. Campbell, N. Sabet, M. Gerrits, A. Bonen, und M. E. Harper. Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. *FASEB J.*, 19(8):977–979, 2005.
- C. C. Bicho, F. de Lima Alves, Z. A. Chen, J. Rappsilber, und K. E. Sawin. A genetic engineering solution to the arginine conversion problem in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Mol. Cell Proteomics*, 9:1567–1577, 2010.
- N. Bodyak, P. M. Kang, M. Hiromura, I. Sulijoadikusumo, N. Horikoshi, K. Khrapko, und A. Usheva. Gene expression profiling of the aging mouse cardiac myocytes. *Nucleic Acids Res.*, 30(17):3788–3794, 2002.
- P. J. Boersema, R. Raijmakers, S. Lemeer, S. Mohammed, und A. J. Heck. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat Protoc*, 4(4):484–494, 2009.
- A. Bokov, A. Chaudhuri, und A. Richardson. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.*, 125(10-11):811–826, 2004.
- T. Bonaldi, T. Straub, J. Cox, C. Kumar, P. B. Becker, und M. Mann. Combined use of RNAi and quantitative proteomics to study gene function in *Drosophila*. *Mol. Cell*, 31:762–772, 2008.
- N. Bousette, T. Kislinger, V. Fong, R. Isserlin, J. A. Hewel, A. Emil, und A. O. Gramolini. Large-scale characterization and analysis of the murine cardiac proteome. *J. Proteome Res.*, 8(4):1887–1901, 2009.

- M. A. Bowen, D. D. Patel, X. Li, B. Modrell, A. R. Malacko, W. C. Wang, H. Marquardt, M. Neubauer, J. M. Pesando, und U. Francke. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J. Exp. Med.*, 181:2213–2220, 1995.
- M. A. Bowen, J. Bajorath, M. D’Egidio, G. S. Whitney, D. Palmer, J. Kobarg, G. C. Starling, A. W. Siadak, und A. Aruffo. Characterization of mouse ALCAM (CD166): the CD6-binding domain is conserved in different homologs and mediates cross-species binding. *Eur. J. Immunol.*, 27:1469–1478, 1997.
- M. D. Brand, R. Pamplona, M. Portero-Otin, J. R. Requena, S. J. Roebuck, J. A. Buckingham, J. C. Clapham, und S. Cadenas. Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. *Biochem. J.*, 368(Pt 2):597–603, 2002.
- P. Burkovics, I. Hajdu, V. Szukacsov, I. Unk, und L. Haracska. Role of PCNA-dependent stimulation of 3’-phosphodiesterase and 3’-5’ exonuclease activities of human Ape2 in repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.*, 37:4247–4255, 2009.
- C. G. Burns und C. A. MacRae. Purification of hearts from zebrafish embryos. *BioTechniques*, 40:274, 276, 278 passim, 2006.
- L. Carrier, K. R. Boheler, C. Chassagne, D. de la Bastie, C. Wisnewsky, E. G. Lakatta, und K. Schwartz. Expression of the sarcomeric actin isogenes in the rat heart with development and senescence. *Circ. Res.*, 70(5):999–1005, 1992.
- B. Chakravarti, M. Oseguera, N. Dalal, P. Fathy, B. Mallik, A. Raval, und D. N. Chakravarti. Proteomic profiling of aging in the mouse heart: Altered expression of mitochondrial proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 474:22–31, 2008.
- C. S. Choi, J. J. Fillmore, J. K. Kim, Z. X. Liu, S. Kim, E. F. Collier, A. Kulkarni, A. Distefano, Y. J. Hwang, M. Kahn, Y. Chen, C. Yu, I. K. Moore, R. M. Reznick, T. Higashimori, und G. I. Shulman. Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 117(7):1995–2003, 2007.
- P. Chomczynski und N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162:156–159, 1987.

- P. Choudhry, D. Joshi, B. Funke, und N. Trede. Alcama mediates Edn1 signaling during zebrafish cartilage morphogenesis. *Dev. Biol.*, 349:483–493, 2011.
- V. M. Christoffels, P. E. Habets, D. Franco, M. Campione, F. de Jong, W. H. Lamers, Z. Z. Bao, S. Palmer, C. Biben, R. P. Harvey, und A. F. Moorman. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev. Biol.*, 223:266–278, 2000.
- P. H. Chu und J. Chen. The novel roles of four and a half LIM proteins 1 and 2 in the cardiovascular system. *Chang Gung Med J*, 34:127–134, 2011.
- K. A. Cieslik, G. E. Taffet, S. Carlson, J. Hermosillo, J. Trial, und M. L. Entman. Immune-inflammatory dysregulation modulates the incidence of progressive fibrosis and diastolic stiffness in the aging heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 50(1):248–256, 2011.
- W. Clauss und C. Clauss. *Tierphysiologie Kompakt*. Spektrum Akademischer Verlag, 2006. ISBN 9783827416612.
- A. J. Claydon, S. A. Ramm, A. Pennington, J. L. Hurst, P. Stockley, und R. J. Beynon. Heterogenous turnover of sperm and seminal vesicle proteins in the mouse revealed by dynamic metabolic labelling. *Mol Cell Proteomics*, 2012.
- A. Contreras-Ramos, C. Sanchez-Gomez, R. Fierro-Pastrana, H. Gonzalez-Marquez, F. Acosta-Vazquez, und J. Arellano-Galindo. Normal development of the muscular region of the interventricular septum. II. The importance of myocardial proliferation. *Anat Histol Embryol*, 38:219–228, 2009.
- G. L. Corthals, V. C. Wasinger, D. F. Hochstrasser, und J. C. Sanchez. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis*, 21(6):1104–1115, 2000.
- J. Cox und M. Mann. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.*, 26(12):1367–1372, 2008.
- J. Cox und M. Mann. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. *Annu. Rev. Biochem.*, 80:273–299, 2011.
- J. Cox, I. Matic, M. Hilger, N. Nagaraj, M. Selbach, J. V. Olsen, und M. Mann. A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nat Protoc*, 4:698–705, 2009.

-
- L. D'Amico, I. C. Scott, B. Jungblut, und D. Y. Stainier. A mutation in zebrafish *hmgcr1b* reveals a role for isoprenoids in vertebrate heart-tube formation. *Curr. Biol.*, 17:252–259, 2007.
- L. M. de Godoy, J. V. Olsen, J. Cox, M. L. Nielsen, N. C. Hubner, F. Frohlich, T. C. Walther, und M. Mann. Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast. *Nature*, 455:1251–1254, 2008.
- E. de Pater, L. Clijsters, S. R. Marques, Y. F. Lin, Z. V. Garavito-Aguilar, D. Yelon, und J. Bakkers. Distinct phases of cardiomyocyte differentiation regulate growth of the zebrafish heart. *Development*, 136(10):1633–1641, 2009.
- H. Diekmann und C. A. Stuermer. Zebrafish *neuroilin-a* and *-b*, orthologs of *ALCAM*, are involved in retinal ganglion cell differentiation and retinal axon pathfinding. *J. Comp. Neurol.*, 513:38–50, 2009.
- P. D. Dong, C. A. Munson, W. Norton, C. Crosnier, X. Pan, Z. Gong, C. J. Neumann, und D. Y. Stainier. *Fgf10* regulates hepatopancreatic ductal system patterning and differentiation. *Nat. Genet.*, 39:397–402, 2007.
- H. C. Drexler, A. Ruhs, A. Konzer, L. Mendler, M. Bruckskotten, M. Looso, S. Gunther, T. Boettger, M. Kruger, und T. Braun. On marathons and sprints: an integrated quantitative proteomics and transcriptomics analysis of differences between slow and fast muscle fibers. *Mol Cell Proteomics*, 2011.
- R. Eckert. *Tierphysiologie*. Thieme, 2002. ISBN 9783136640043.
- E. Eden, R. Navon, I. Steinfeld, D. Lipson, und Z. Yakhini. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*, 10:48, 2009.
- J. S. Eisen und J. C. Smith. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development*, 135:1735–1743, 2008.
- I. Forne, J. Abian, und J. Cerda. Fish proteome analysis: model organisms and non-sequenced species. *Proteomics*, 10:858–872, 2010.
- L. J. Foster und M. Mann. *Protein identification and sequencing by mass spectrometry*, volume 4. Academic Press, San Diego, 3rd edition, 2005.

- T. Geiger, J. Cox, P. Ostasiewicz, J. R. Wisniewski, und M. Mann. Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nat. Methods*, 7:383–385, 2010.
- T. Geiger, J. R. Wisniewski, J. Cox, S. Zanivan, M. Kruger, Y. Ishihama, und M. Mann. Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture as a spike-in standard in quantitative proteomics. *Nat Protoc*, 6:147–157, 2011.
- T. Geiger, A. Wehner, C. Schaab, J. Cox, und M. Mann. Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. *Mol Cell Proteomics*, 2012.
- R. C. Gentleman, V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, und J. Gentry. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, 10:R80, 2004.
- S. Gessert, D. Maurus, T. Brade, P. Walther, P. Pandur, und M. Kuhl. 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, 2008.
- F. Goglia und V. P. Skulachev. A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J.*, 17(12):1585–1591, 2003.
- J. M. Gonzalez-Rosa, V. Martin, M. Peralta, M. Torres, und N. Mercader. Extensive scar formation and regression during heart regeneration after cryoinjury in zebrafish. *Development*, 138:1663–1674, 2011.
- J. W. Gouw, J. Krijgsveld, und A. J. Heck. Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Mol. Cell Proteomics*, 9:11–24, 2010.
- A. Gruhler, J. V. Olsen, S. Mohammed, P. Mortensen, N. J. Faergeman, M. Mann, und O. N. Jensen. Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol. Cell Proteomics*, 4:310–327, 2005.
- W. G. Guder, S. Purschel, und G. Wirthensohn. Renal ketone body metabolism. Distribution of 3-oxoacid CoA-transferase and 3-hydroxybutyrate dehydrogenase along the mouse nephron. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 364(12):1727–1737, 1983.

- M. S. Hestand, A. Klingenhoff, M. Scherf, Y. Ariyurek, Y. Ramos, W. van Workum, M. Suzuki, T. Werner, G. J. van Ommen, J. T. den Dunnen, M. Harbers, und P. A. 't Hoen. Tissue-specific transcript annotation and expression profiling with complementary next-generation sequencing technologies. *Nucleic Acids Res.*, 38(16):e165, 2010.
- C. Himeda und S. Hauschka. Proteomic strategies for understanding cardiac function, development and disease. In N. Rosenthal und R. Harvey, editors, *Heart Development and Regeneration*, volume 1, chapter 11.4, pages 793–804. Elsevier/Academic Press, 2010.
- H. Hirata, Y. Murakami, Y. Miyamoto, M. Tosaka, K. Inoue, A. Nagahashi, L. M. Jakt, T. Asahara, H. Iwata, Y. Sawa, und S. Kawamata. ALCAM (CD166) is a surface marker for early murine cardiomyocytes. *Cells Tissues Organs (Print)*, 184:172–180, 2006.
- N. G. Holtzman, J. J. Schoenebeck, H. J. Tsai, und D. Yelon. Endocardium is necessary for cardiomyocyte movement during heart tube assembly. *Development*, 134:2379–2386, 2007.
- C. J. Huang, C. T. Tu, C. D. Hsiao, F. J. Hsieh, und H. J. Tsai. Germ-line transmission of a myocardium-specific GFP transgene reveals critical regulatory elements in the cardiac myosin light chain 2 promoter of zebrafish. *Dev. Dyn.*, 228(1):30–40, 2003.
- O. M. Hyyti, D. Ledee, X. H. Ning, M. Ge, und M. A. Portman. Aging impairs myocardial fatty acid and ketone oxidation and modifies cardiac functional and metabolic responses to insulin in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 299(3):H868–875, 2010.
- K. B. Jensen und F. M. Watt. Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: Lrig1 is a regulator of stem cell quiescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:11958–11963, 2006.
- C. Jopling, E. Sleep, M. Raya, M. Marti, A. Raya, und J. C. Izpisua Belmonte. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*, 464:606–609, 2010.
- J. Kajstura, N. Gurusamy, B. Ogorek, P. Goichberg, C. Clavo-Rondon, T. Hosoda, D. D'Amario, S. Bardelli, A. P. Beltrami, D. Cesselli, R. Bussani, F. del Monte, F. Quaini, M. Rota, C. A. Beltrami, B. A. Buchholz, A. Leri, und P. Anversa. Myocyte turnover in the aging human heart. *Circ. Res.*, 107(11):1374–1386, 2010.

- M. Kanehisa und S. Goto. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.*, 28(1):27–30, 2000.
- J. P. Kanki, S. Chang, und J. Y. Kuwada. The molecular cloning and characterization of potential chick DM-GRASP homologs in zebrafish and mouse. *J. Neurobiol.*, 25:831–845, 1994.
- K. Kardong. Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution. McGraw-Hill, 2002.
- A. M. Kates, P. Herrero, C. Dence, P. Soto, M. Srinivasan, D. G. Delano, A. Ehsani, und R. J. Gropler. Impact of aging on substrate metabolism by the human heart. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 41(2):293–299, 2003.
- B. R. Keegan, D. Meyer, und D. Yelon. Organization of cardiac chamber progenitors in the zebrafish blastula. *Development*, 131:3081–3091, 2004.
- B. R. Keegan, J. L. Feldman, G. Begemann, P. W. Ingham, und D. Yelon. Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool. *Science*, 307:247–249, 2005.
- J. Kerner, P. J. Turkaly, P. E. Minkler, und C. L. Hoppel. Aging skeletal muscle mitochondria in the rat: decreased uncoupling protein-3 content. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 281(5):E1054–1062, 2001.
- J. Keul, E. Doll, H. Steim, U. Fleer, und H. Reindell. Über den stoffwechsel des menschlichen herzens. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 282:43–53, 1965. ISSN 0031-6768. URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF00363207>. 10.1007/BF00363207.
- K. Kikuchi, J. E. Holdway, A. A. Werdich, R. M. Anderson, Y. Fang, G. F. Egnaczyk, T. Evans, C. A. Macrae, D. Y. Stainier, und K. D. Poss. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by *gata4(+)* cardiomyocytes. *Nature*, 464:601–605, 2010.
- C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, und T. F. Schilling. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, 203:253–310, 1995.
- M. Kinter und N. E. Sherman. *Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry*. John Wiley and Sons, 2000.
- A. L. Kirchmaier. Ub-family modifications at the replication fork: Regulating PCNA-interacting components. *FEBS Lett.*, 585:2920–2928, 2011.

- M. Kruger, M. Moser, S. Ussar, I. Thievensen, C. A. Lubber, F. Forner, S. Schmidt, S. Zanivan, R. Fassler, und M. Mann. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell*, 134:353–364, 2008.
- C. Kutzleb, E. Petrasch-Parwez, und M. W. Kilimann. Cellular and subcellular localization of paralemmin-1, a protein involved in cell shape control, in the rat brain, adrenal gland and kidney. *Histochem. Cell Biol.*, 127:13–30, 2007.
- M. LaBarbera und S. Vogel. The design of fluid transport systems in organisms. *Am. Sci.*, 70:54–60, 1982.
- U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- E. G. Lakatta. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation*, 107:490–497, 2003.
- A. D. Langenbacher, C. T. Nguyen, A. M. Cavanaugh, J. Huang, F. Lu, und J. N. Chen. The PAF1 complex differentially regulates cardiomyocyte specification. *Dev. Biol.*, 353(1):19–28, 2011.
- M. Larance, A. P. Bailly, E. Pourkarimi, R. T. Hay, G. Buchanan, S. Coulthurst, D. P. Xirodimas, A. Gartner, und A. I. Lamond. Stable-isotope labeling with amino acids in nematodes. *Nat. Methods*, 8:849–851, 2011.
- C. K. Lee, D. B. Allison, J. Brand, R. Weindruch, und T. A. Prolla. Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(23):14988–14993, 2002.
- S. Lemeer, C. Jopling, J. Gouw, S. Mohammed, A. J. Heck, M. Slijper, und J. den Hertog. Comparative phosphoproteomics of zebrafish Fyn/Yes morpholino knockdown embryos. *Mol. Cell Proteomics*, 7(11):2176–2187, 2008a.
- S. Lemeer, M. W. Pinkse, S. Mohammed, B. van Breukelen, J. den Hertog, M. Slijper, und A. J. Heck. Online automated in vivo zebrafish phosphoproteomics: from large-scale analysis down to a single embryo. *J. Proteome Res.*, 7(4):1555–1564, 2008b.

- E. J. Lesnefsky, S. Moghaddas, B. Tandler, J. Kerner, und C. L. Hoppel. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia–reperfusion, aging, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 33(6):1065–1089, 2001.
- J. Liu und D. Y. Stainier. Tbx5 and Bmp signaling are essential for proepicardium specification in zebrafish. *Circ. Res.*, 106:1818–1828, 2010.
- O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, und R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265–275, 1951.
- M. B. Lucitt, T. S. Price, A. Pizarro, W. Wu, A. K. Yocum, C. Seiler, M. A. Pack, I. A. Blair, G. A. Fitzgerald, und T. Grosser. Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development. *Mol. Cell Proteomics*, 7:981–994, 2008.
- A. Makarov, E. Denisov, A. Kholomeev, W. Balschun, O. Lange, K. Strupat, und S. Horning. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.*, 78:2113–2120, 2006.
- S. Makino, G. G. Whitehead, C. L. Lien, S. Kim, P. Jhawar, A. Kono, Y. Kawata, und M. T. Keating. Heat-shock protein 60 is required for blastema formation and maintenance during regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(41):14599–14604, 2005.
- A. M. Masino, T. D. Gallardo, C. A. Wilcox, E. N. Olson, R. S. Williams, und D. J. Garry. Transcriptional regulation of cardiac progenitor cell populations. *Circ. Res.*, 95:389–397, 2004.
- G. D. Maurer, D. P. Brucker, O. Bahr, P. N. Harter, E. Hattingen, S. Walenta, W. Mueller-Klieser, J. P. Steinbach, und J. Rieger. Differential utilization of ketone bodies by neurons and glioma cell lines: a rationale for ketogenic diet as experimental glioma therapy. *BMC Cancer*, 11:315, 2011.
- S. Mohsin, S. Siddiqi, B. Collins, und M. A. Sussman. Empowering adult stem cells for myocardial regeneration. *Circ. Res.*, 109(12):1415–1428, 2011.
- S. Morais, L. Conceicao, M. T. Dinis, und I. Ronnestad. A method for radiolabeling artemia with applications in studies of food intake, digestibility, protein and amino acid metabolism in larval fish. *Aquaculture*, 231:469 – 487, 2004.

- M. Nabben, J. Hoeks, J. J. Briede, J. F. Glatz, E. Moonen-Kornips, M. K. Hesselink, und P. Schrauwen. The effect of UCP3 overexpression on mitochondrial ROS production in skeletal muscle of young versus aged mice. *FEBS Lett.*, 582(30):4147–4152, 2008.
- N. Nagaraj, J. R. Wisniewski, T. Geiger, J. Cox, M. Kircher, J. Kelso, S. Paabo, und M. Mann. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol. Syst. Biol.*, 7:548, 2011.
- A. Nasevicius und S. C. Ekker. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet.*, 26:216–220, 2000.
- J. M. Nelissen, I. M. Peters, B. G. de Grooth, Y. van Kooyk, und C. G. Figdor. Dynamic regulation of activated leukocyte cell adhesion molecule-mediated homotypic cell adhesion through the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell*, 11:2057–2068, 2000.
- V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, und W. Ehrhardt. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9:255–262, 1988.
- T. D. O'Connell, M. C. Rodrigo, und P. C. Simpson. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol. Biol.*, 357:271–296, 2007.
- Y. Oda, K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn, und B. T. Chait. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:6591–6596, 1999.
- S. F. Ofori-Aquah und J. A. King. Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. *Transl Res*, 151:122–128, 2008.
- G. Olivetti, M. Melissari, J. M. Capasso, und P. Anversa. Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ. Res.*, 68:1560–1568, 1991.
- J. V. Olsen, J. C. Schwartz, J. Griep-Raming, M. L. Nielsen, E. Damoc, E. Denisov, O. Lange, P. Remes, D. Taylor, M. Splendore, E. R. Wouters, M. Senko, A. Makarov, M. Mann, und S. Horning. A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol. Cell Proteomics*, 8:2759–2769, 2009.

- S. E. Ong und M. Mann. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc*, 1:2650–2660, 2006.
- S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, und M. Mann. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics*, 1:376–386, 2002.
- C. A. Ottenheijm, H. Granzier, und S. Labeit. The sarcomeric protein nebulin: another multifunctional giant in charge of muscle strength optimization. *Front Physiol*, 3:37, 2012.
- S. K. Park, G. P. Page, K. Kim, D. B. Allison, M. Meydani, R. Weindruch, und T. A. Prolla. alpha- and gamma-Tocopherol prevent age-related transcriptional alterations in the heart and brain of mice. *J. Nutr.*, 138(6):1010–1018, 2008.
- G. Pass. Accessory pulsatile organs: evolutionary innovations in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 45:495–518, 2000.
- J. D. Peduzzi, M. H. Irwin, und E. E. Geisert. Distribution and characteristics of a 90 kDa protein, KG-CAM, in the rat CNS. *Brain Res.*, 640:296–307, 1994.
- P. Picotti, B. Bodenmiller, L. N. Mueller, B. Domon, und R. Aebersold. Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell*, 138(4):795–806, 2009.
- B. Puisac, M. Ramos, M. Arnedo, S. Menao, M. C. Gil-Rodriguez, M. E. Teresa-Rodrigo, A. Pie, J. C. de Karam, J. J. Wesselink, I. Gimenez, F. J. Ramos, N. Casals, P. Gomez-Puertas, F. G. Hegardt, und J. Pie. Characterization of splice variants of the genes encoding human mitochondrial HMG-CoA lyase and HMG-CoA synthase, the main enzymes of the ketogenesis pathway. *Mol. Biol. Rep.*, 39(4):4777–4785, 2012.
- J. Rappsilber, Y. Ishihama, und M. Mann. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.*, 75:663–670, 2003.
- J. F. Reiter, H. Verkade, und D. Y. Stainier. Bmp2b and Oep promote early myocardial differentiation through their regulation of gata5. *Dev. Biol.*, 234:330–338, 2001.

- S. Rohr, C. Otten, und S. Abdelilah-Seyfried. Asymmetric involution of the myocardial field drives heart tube formation in zebrafish. *Circ. Res.*, 102:e12–19, 2008.
- A. Romer. Circulation of body fluids. In W. Saunders, editor, *The vertebrate body*, volume 2, pages 386–434. Oxford University Press, 1962.
- P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlett-Jones, F. He, A. Jacobson, und D. J. Pappin. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics*, 3(12):1154–1169, 2004.
- A. Ruhs, F. Cemic, T. Braun, und M. Krüger. ResA: a Web Tool for Resampling Analysis of Arbitrary Annotations. *Plos One*, In Revision.
- J. Sambrook, E. Fritsch, und T. Maniatis. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- R. Sandberg und O. Larsson. Improved precision and accuracy for microarrays using updated probe set definitions. *BMC Bioinformatics*, 8:48, 2007.
- S. Saxena, S. K. Singh, M. G. Meena Lakshmi, V. Meghah, B. Bhatti, C. V. Brahmendra Swamy, C. S. Sundaram, und M. M. Idris. Proteomic analysis of zebrafish caudal fin regeneration. *Mol Cell Proteomics*, 2012.
- R. Schoenheimer und D. Rittenberg. Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. *Science*, 82:156–157, 1935.
- A. Scholten, S. Mohammed, T. Y. Low, S. Zanivan, T. A. van Veen, B. Delanghe, und A. J. Heck. In-depth quantitative cardiac proteomics combining electron transfer dissociation and the metalloendopeptidase Lys-N with the SILAC mouse. *Mol. Cell Proteomics*, 10:O111.008474, 2011.
- B. Schwanhausser, D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen, und M. Selbach. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473:337–342, 2011.
- I. Scott und D. Yelon. Cardiac development in the zebrafish. In N. Rosenthal und R. Harvey, editors, *Heart Development and Regeneration*, volume 1, chapter 1.4, pages 102–120. Elsevier/Academic Press, 2010.

- A. J. Sehnert, A. Huq, B. M. Weinstein, C. Walker, M. Fishman, und D. Y. Stainier. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat. Genet.*, 31:106–110, 2002.
- A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen, und M. Mann. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 1:2856–2860, 2006.
- A. J. Siccardi, H. W. Garris, W. T. Jones, D. B. Moseley, L. R. D’Abramo, und S. A. Watts. Growth and survival of zebrafish (*Danio rerio*) fed different commercial and laboratory diets. *Zebrafish*, 6:275–280, 2009.
- M. S. Simoes-Costa, M. Vasconcelos, A. C. Sampaio, R. M. Cravo, V. L. Linhares, T. Hochgreb, C. Y. Yan, B. Davidson, und J. Xavier-Neto. The evolutionary origin of cardiac chambers. *Dev. Biol.*, 277:1–15, 2005.
- E. Sleep, S. Boue, C. Jopling, M. Raya, A. Raya, und J. C. Izpisua Belmonte. Transcriptomics approach to investigate zebrafish heart regeneration. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 11:369–380, 2010.
- G. K. Smyth, J. Michaud, und H. S. Scott. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*, 21:2067–2075, May 2005.
- E. J. Soderblom, M. Philipp, J. W. Thompson, M. G. Caron, und M. A. Moseley. Quantitative label-free phosphoproteomics strategy for multifaceted experimental designs. *Anal. Chem.*, 83(10):3758–3764, 2011.
- L. Solnica-Krezel, A. F. Schier, und W. Driever. Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics*, 136(4):1401–1420, 1994.
- B. Soufi, C. Kumar, F. Gnad, M. Mann, I. Mijakovic, und B. Macek. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) applied to quantitative proteomics of *Bacillus subtilis*. *J. Proteome Res.*, 9:3638–3646, 2010.
- J. E. Squires, J. Sun, J. L. Caffrey, D. Yoshishige, und R. T. Mallet. Acetoacetate augments beta-adrenergic inotropism of stunned myocardium by an antioxidant mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 284(4):H1340–1347, 2003.

- D. Y. Stainier, R. K. Lee, und M. C. Fishman. Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Development*, 119:31–40, 1993.
- M. D. Sury, J. X. Chen, und M. Selbach. The SILAC fly allows for accurate protein quantification in vivo. *Mol. Cell Proteomics*, 9:2173–2183, 2010.
- D. L. Swaney, C. D. Wenger, und J. J. Coon. Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics. *J. Proteome Res.*, 9(3):1323–1329, 2010.
- T. L. Tal, J. A. Franzosa, und R. L. Tanguay. Molecular signaling networks that choreograph epimorphic fin regeneration in zebrafish - a mini-review. *Gerontology*, 56:231–240, 2010.
- T. L. Tay, Q. Lin, T. K. Seow, K. H. Tan, C. L. Hew, und Z. Gong. Proteomic analysis of protein profiles during early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Proteomics*, 6: 3176–3188, 2006.
- S. Ueno, G. Weidinger, T. Osugi, A. D. Kohn, J. L. Golob, L. Pabon, H. Reinecke, R. T. Moon, und C. E. Murry. 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, Jun 2007.
- D. M. Walther und M. Mann. Accurate quantification of more than 4000 mouse tissue proteins reveals minimal proteome changes during aging. *Mol. Cell Proteomics*, 10: M110.004523, 2011.
- T. C. Walther und M. Mann. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J. Cell Biol.*, 190(4):491–500, 2010.
- J. Wang, D. Panakova, K. Kikuchi, J. E. Holdway, M. Gemberling, J. S. Burris, S. P. Singh, A. L. Dickson, Y. F. Lin, M. K. Sabeh, A. A. Werdich, D. Yelon, C. A. Macrae, und K. D. Poss. The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development*, 138:3421–3430, 2011.
- J. A. Weiner, S. J. Koo, S. Nicolas, S. Fraboulet, S. L. Pfaff, O. Pourquie, und J. R. Sanes. Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobulin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1. *Mol. Cell. Neurosci.*, 27: 59–69, 2004.

- M. Westerfield. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, Eugene, 4th edition, 2000.
- A. Westman-Brinkmalm, A. Abramsson, J. Pannee, C. Gang, M. K. Gustavsson, M. von Otter, K. Blennow, G. Brinkmalm, H. Heumann, und H. Zetterberg. SILAC zebrafish for quantitative analysis of protein turnover and tissue regeneration. *J Proteomics*, 75: 425–434, 2011.
- J. R. Wisniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, und M. Mann. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods*, 6:359–362, 2009.
- J. Xavier-Neto, B. Davidson, M. Simoes-Costa, R. Castro, H. Castillo, A. Sampaio, und A. Azambuja. Evolutionary origin of the heart. In N. Rosenthal und R. Harvey, editors, *Heart Development and Regeneration*, volume 1, chapter 1.1, pages 3–45. Elsevier/Academic Press, 2010.
- D. Yelon, S. A. Horne, und D. Y. Stainier. Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish. *Dev. Biol.*, 214:23–37, 1999.
- D. Yelon, B. Ticho, M. E. Halpern, I. Ruvinsky, R. K. Ho, L. M. Silver, und D. Y. Stainier. The bHLH transcription factor *hand2* plays parallel roles in zebrafish heart and pectoral fin development. *Development*, 127:2573–2582, 2000.
- X. Yin, F. Cuello, U. Mayr, Z. Hao, M. Hornshaw, E. Ehler, M. Avkiran, und M. Mayr. Proteomics analysis of the cardiac myofilament subproteome reveals dynamic alterations in phosphatase subunit distribution. *Mol. Cell Proteomics*, 9(3):497–509, 2010.
- J. Zhang, P. Wagh, D. Guay, L. Sanchez-Pulido, B. K. Padhi, V. Korzh, M. A. Andrade-Navarro, und M. A. Akimenko. Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition. *Nature*, 466:234–237, 2010.
- A. W. Zimmerman, J. M. Nelissen, S. E. van Emst-de Vries, P. H. Willems, F. de Lange, J. G. Collard, F. N. van Leeuwen, und C. G. Figdor. Cytoskeletal restraints regulate homotypic ALCAM-mediated adhesion through PKC α independently of Rho-like GTPases. *J. Cell. Sci.*, 117:2841–2852, 2004.

A. Zusätzliche Abbildungen

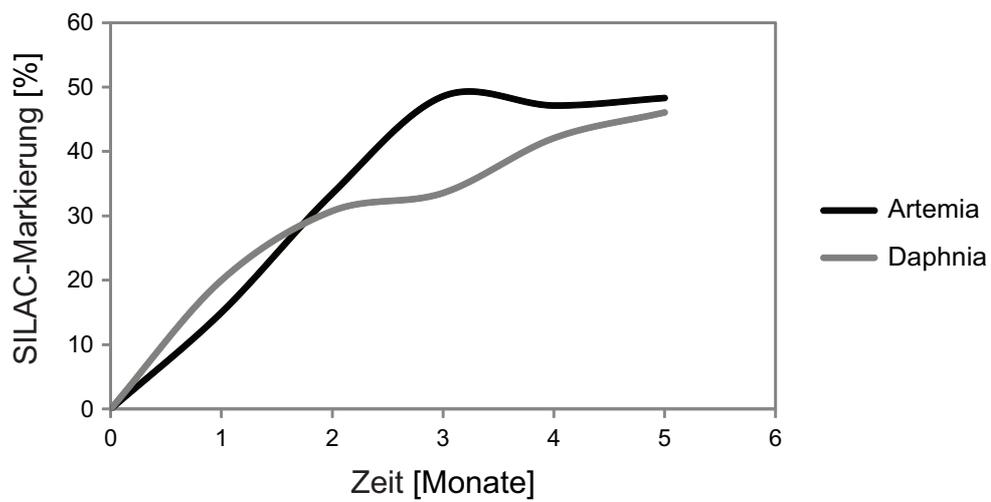


Abbildung 37.: Inkorporation von Lysin-6 in *Artemia* und *Daphnia*. Die durchschnittlichen Markierungsraten beider Organismen wurden gegen die Zeit aufgetragen. Nach 5 Monaten konnte eine Inkorporation von 48% (*Artemia*) und 46% (*Daphnia*) detektiert werden.

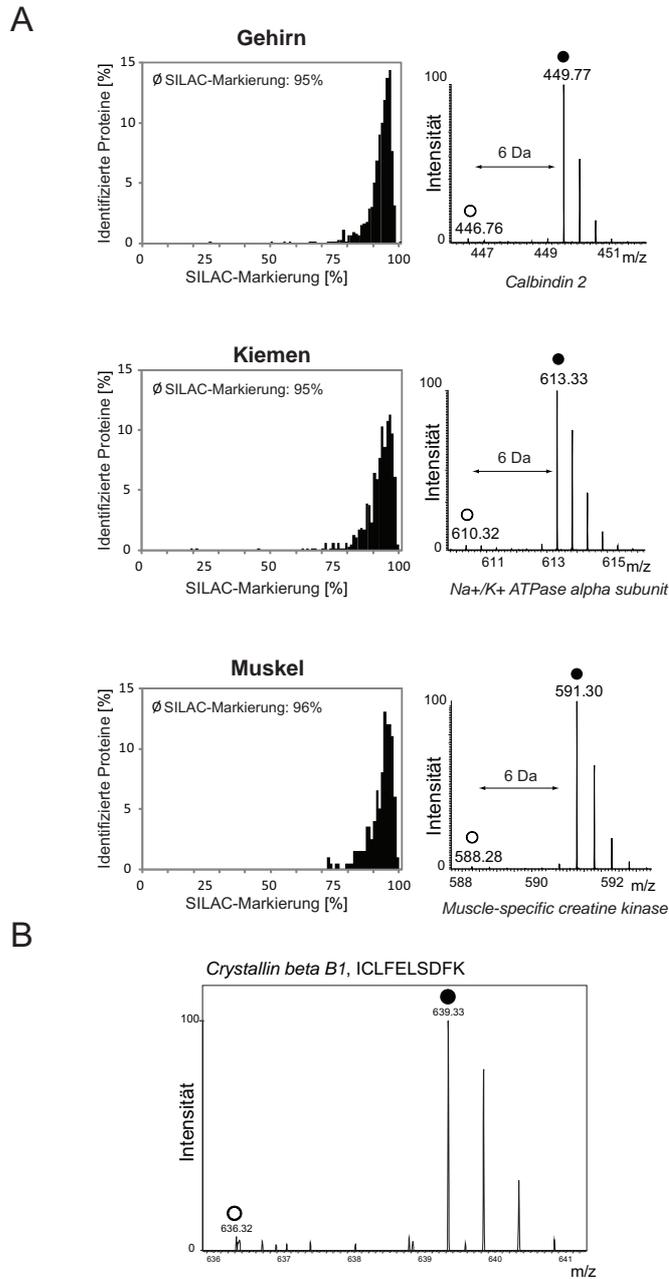


Abbildung 38.: Gewebespezifische Inkorporation von Lysin-6 in vollständig markierten SILAC-Zebrafischen. (A) Die Markierungsraten der Organe Gehirn ($n = 729$), Kiemen ($n = 640$) und Muskel ($n = 199$) der F1-Generation wurden in Balkendiagramme gegen die relative Häufigkeit (in %) aufgetragen. Mittlere Markierungsraten sind jeweils als Ø SILAC-Markierung angegeben. Exemplarische MS-Spektren von Proteinen aus den entsprechenden Organen sind neben den Balkendiagrammen dargestellt und belegen die hohe Lysin-6-Inkorporation. (B) MS-Spektrum von *Crystallin beta B1*.

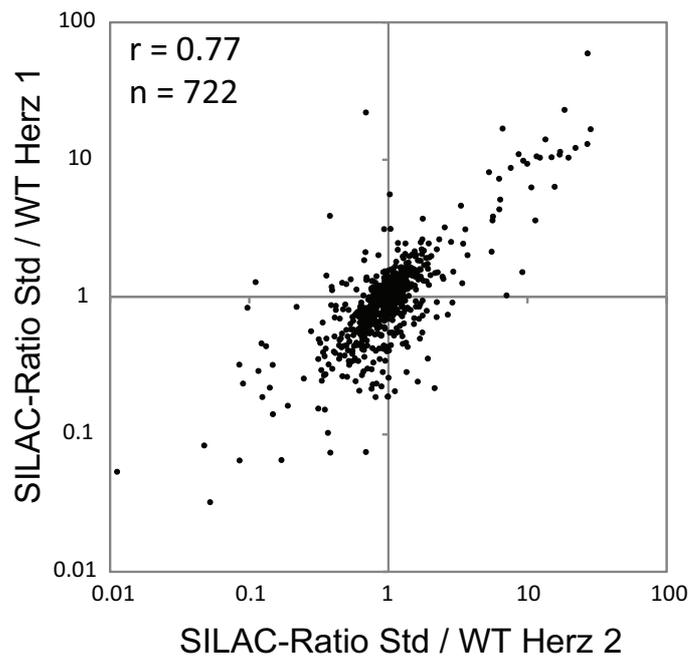


Abbildung 39.: Korrelation zwischen biologischen Duplikaten von Proteinproben isolierter embryonaler Herzen. Herzen von unmarkierten Wildtyp-Embryonen in einem Alter von 72 hpf wurden in zwei Ansätzen isoliert und jeweils mit einer Probe vollständig markierter SILAC-Embryonen (72 hpf) gemischt. Die Pearson-Korrelation zwischen beiden Experimenten beträgt 0,77, wodurch die Reproduzierbarkeit der SILAC-Proteinquantifizierung anhand isolierter, embryonaler Herzen belegt wurde.

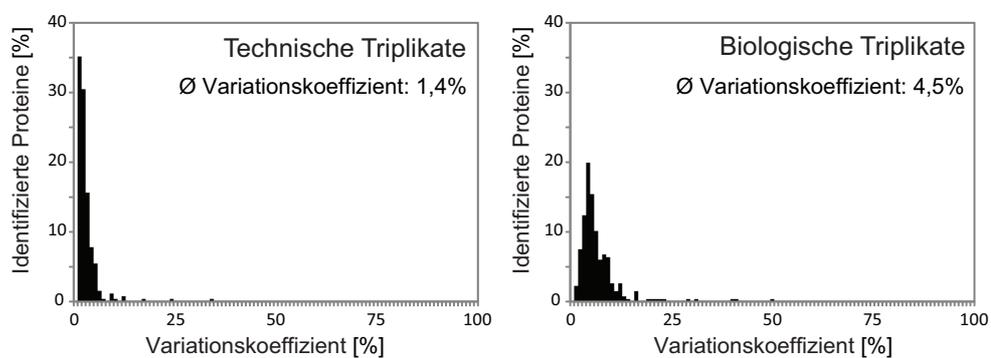


Abbildung 40.: Die Variationskoeffizienten zwischen den SILAC-Ratios der detektierten Proteine aus den technischen bzw. biologischen Tripilkaten wurden im Balkendiagramm gegen die relative Häufigkeit (in %, Y-Achse) aufgetragen. Der mittlere Variationskoeffizient der biologischen Triplikate (4,5%) ist im Vergleich zu den technischen Triplikaten (1,4%) etwa dreimal höher.

B. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
A	
ABC	Ammoniumbicarbonat
ADP	Adenosindiphosphat
ALCAM	<i>activated leukocyte cell adhesion molecule</i>
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
B	
bzw.	beziehungsweise
C	
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
CSC	kardiale Stammzelle (<i>cardiac stem cell</i>)
D	
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
E	
ES	embryonale Stammzellen
ESI	Elektrospray-Ionisation
F	
FC	<i>fold change</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>

G

g	Gramm
GFP	grün-fluoreszierendes Proteine (<i>green fluorescence protein</i>)

H

hpf	Stunden nach der Befruchtung (<i>hours post fertilization</i>)
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)

I

i.Tr.	in der Trockenmasse
IAA	Iodacetamid
in vivo	Lateinisch für <i>im Lebendigen</i>

K

kV	Kilovolt
----	----------

L

¹² C ₆ -Lysin	Lysin-0
¹³ C ₆ -Lysin	Lysin-6
l	Liter
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
log ₂	Logarithmusfunktion zur Basis 2
LTQ	lineare Ionenfalle (<i>linear trap quadrupole</i>)

M

m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
M	molar
min	Minute(n)
mind.	mindestens
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (<i>hydrargyrum</i>)
MO	Morpholino <i>antisense</i> Oligonukleotide
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie

N

NGS	<i>next-generation sequencing</i>
-----	-----------------------------------

P

PBS	Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PTM	posttranslationale Modifikationen

R

RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reverse phase</i>)
RyR	Ryanodinrezeptor
S	
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
sog.	sogenannt
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
U	
u.a.	unter anderem
W	
WT	Wildtyp(en)
Z	
z. B.	zum Beispiel

C. Tabellen

Tabelle 1.: Ergebnisse der SILAC-Studie der embryonalen Herzentwicklung. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die rot markierten Proteine der Abbildung 23, die zum Zeitpunkt 120 hpf eine mindestens zweifache Regulation zeigen.

Proteinname	Uniprot	FC 120/72 hpf (log ₂)
ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1 like (SERCA)	A0JMP4	3,41
Tropomyosin 1 α	Q6P0W3	3,20
Tropomyosin 4	Q1LXM1	2,71
Troponin I, skeletal, fast 2b.2	Q6DHP2	2,25
Actinin alpha 3b	Q6P0J5	2,25
Calsequestrin	Q7T138	2,15
Novel protein similar to Actinin alpha 1	B8JHU4	2,10
Myosin, heavy polypeptide 2 (Myhz2 protein)	A0JMC2	1,99
Titin b	A5X6X6	1,96
Myosin, heavy polypeptide 11	B3DFS9	1,60
Troponin I, skeletal, fast 2a.4	Q0D2W2	1,50
Catenin (Cadherin-associated protein), alpha 2	B8A6A9	1,26
Slow myosin heavy chain 1	A0MQ61	1,17
Fast skeletal muscle troponin T	Q9I8U9	1,15
Cardiac myosin light chain 2	Q7T2Y1	1,14
Ryanodine receptor 1b	A6P4B8	1,12
Calmodulin	Q6PI52	1,09
Alpha II-spectrin	A3FG33	0,84
Actin alpha, cardiac muscle 1	Q6IQR3	0,83
Laminin gamma 1	Q1LVF0	0,83
Desmin	Q90441	0,71
Titin a	A5X6X5	0,52
Vinculin-like	B3DI32	0,49
Cardiac muscle myosin heavy chain 5 α	A4KUH9	0,48
similar to Plectin 1	E9QCV2	0,44
Crystallin, beta B1	Q6DGZ8	0,39
Enolase 3, (Beta, muscle)	Q568G3	0,30
Creatine kinase, muscle	A2BHA3	0,24
Calpain 3	Q66HU4	0,16
Talin 1	Q5U7N6	0,16

C. Tabellen

Actinin, alpha 4	Q7SYE2	0,11
Myosin binding protein C (Mybpc3 protein)	Q3B7F2	0,07
Ventricular myosin heavy chain	Q9PVE1	-0,06
Laminin alpha 5	Q2Q1W5	-0,07
Laminin beta 1	Q8JHV7	-0,16
similar to myomesin 2	-	-0,21
Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta	Q7SXP1	-0,53

Tabelle 2.: Ergebnisse der SILAC-Studie von ALCAM-Morphanten. Die Tabelle enthält die direkten Ratios zwischen Wildtypen und Kontroll-Morphanten (K-MO) mit einer mindestens zweifachen Regulation. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Abbildung 25B.

Proteinname	Genname	Uniprot	FC K-MO/WT (log ₂)
Ubr5 protein	ubr5	Q642I4	2,31
1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	adi1	Q6PBX5	2,00
Integrin beta	itgb3a	B3DIV8	1,68
Rab5a protein	rab5aa	Q7ZUW5	1,64
Hypothetical LOC572231 protein	LOC572231	A8KB85	1,58
Kinesin family member 13Bb	kif13bb	E7F084	1,52
Uncharacterized protein	akt3a	D9IL79	1,52
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16	dhx16	Q7ZVV8	1,45
Coatomer protein complex, subunit zeta 1	copz1	Q7SXH1	1,25
Complement component C3B	c3b	O73758	1,24
Vtg3 protein	vtg3	Q0P421	1,24
Uncharacterized protein	lgals111	F1QGM0	1,23
Cathepsin B	ctsba	Q6PH75	1,23
Complexin 2	cplx2l	Q6DHG4	1,13
Testis-expressed sequence 10 protein homolog	tex10	Q803M3	1,12
Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog	cxadr	Q90Y50	1,02
Novel protein similar to H.sapiens EPS15, epidermal growth factor receptor pathway substrate 15	-	B8JLE1	1,00
Phosphatidylinositol transfer protein, beta	pitpnb	Q7ZUU3	-1,02
CD9 antigen, like	cd9b	Q1L9G8	-1,27
Synembryn-B	ric8b	Q6DRJ9	-1,46
LOC562067 protein	LOC562067	A7MC24	-1,48
Novel protein similar to vertebrate carboxylesterase family	ces2	Q1LYL6	-1,53
CDNA, clone cssl:d0144	sc:d0144	A4JYJ3	-1,58
Transferrin receptor 1a	tfr1a	A2BHX1	-1,63
Uncharacterized protein	ank3a	F1QNB1	-1,66
Uncharacterized protein	ctsl1b	A7MCM3	-1,77
Novel protein similar to vertebrate meprin family	he1a	Q1LW00	-1,79
Uncharacterized protein	-	E9QB56	-2,24
Akap1b protein	akap1b	A5D6U6	-2,28
Plexin A2	-	B6E521	-2,52

Tabelle 3.: Ergebnisse der SILAC-Studie von ALCAM-Morphanten. Die Tabelle enthält die direkten Ratios zwischen Wildtypen und ALCAM-Morphanten (Alc-MO) mit einer mindestens zweifachen Regulation. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Abbildung 25C.

Proteinname	Genname	Uniprot	FC Alc-MO/WT (log ₂)
Hug protein	hug	B5DDU7	3,19
Leucine rich repeat (In FLII) interacting protein 2	lrrfp2	B8A6F7	3,04
Uncharacterized protein	-	E7FAP3	2,87
Novel protein similar to vertebrate laminin, beta family protein	lamb1b	Q5RH37	2,14
Sept9a-tv1	sept9a	D9IVG1	1,82
S-adenosylmethionine synthase	mat2al	Q1RLT0	1,72
Novel protein similar to quinoid dihydropteridine reductase	qdprb1	A2BIE9	1,60
ATP-dependent RNA helicase	ddx54	Q8JGR2	1,48
Spectrin beta chain, putative-like	-	-	1,39
Putative uncharacterized protein	-	Q5XJ77	1,37
Gamma1a-synuclein	sncgb	Q502J6	1,24
LOC449616 protein	bcl9	B7ZVQ1	1,17
Zgc:109940	cfdl	A7MCG1	1,17
Novel protein similar to gelsolin, like 1	scinlb	A5PMZ3	1,15
Nucleophosmin/nucleoplasmin, 3	npm3	Q5BLA5	1,11
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18	ddx18	Q4V9K8	1,10
Guanine nucleotide-binding protein-like 3	gnl3	Q6DRP2	1,07
MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein	mki67ip	Q8JIY8	1,01
Zgc:56334	nsa2	Q7ZUX9	1,00
Uncharacterized protein	CABZ01048373	E7EZJ2	-1,01
Uncharacterized protein	-	E7F8S4	-1,03
Fatty acid binding protein 7, brain, a	fabp7a	Q90ZG6	-1,04
Glucose-6-phosphate isomerase	gpib	A8DZE4	-1,06
Zgc:65851	zgc:65851	Q7SZP4	-1,07
Myosin, heavy polypeptide 2	myhz2	A0JMC2	-1,15
Ras-related protein Rap-1b	rap1b	Q6TEN1	-1,17
Uncharacterized protein	-	E7FAI9	-1,20
Calbindin 2	calb2b	C5IG40	-1,21
Uncharacterized protein	-	E7F8Q4	-1,23
Uncharacterized protein	sin3aa	A5D6S0	-1,25
Novel protein similar to methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	methfd1l	Q5PNN4	-1,26
Solute carrier family 1 (Glial high affinity glutamate transporter) member 2	slc1a2b	B7TWQ9	-1,32
Retinal pigment epithelium 65a	rpe65a	Q6PBW5	-1,32
Novel protein similar to vertebrate calpain 2	capn2b	A3KPI0	-1,36
Malate dehydrogenase	mdh1b	Q7ZSY2	-1,38
Adenosine monophosphate deaminase 1	ampd1	Q6P3G5	-1,39

C. Tabellen

Novel protein similar to vertebrate dipeptidyl-peptidase 4	fap	B0R1C4	-1,43
Zgc:85963	epb41l3b	Q6NSM6	-1,43
Beta A2-crystallin	cryba2a	Q6IQU2	-1,47
Phb protein	phb	Q7T1D8	-1,59
LOC794362 protein	-	A9JRN9	-1,65
Matrilin 1	matn1	A5WWJ4	-1,73
Enolase 2	eno2	Q1LYP3	-1,91
CD166 antigen homolog A (ALCAM)	alcama	Q90460	-2,07
Uncharacterized protein	zgc:114180	Q4V8S2	-2,16
Arrestin 3, retinal (X-arrestin), like	arr3a	Q6DH07	-2,86

Tabelle 4.: Ergebnisse der Genexpressionanalyse von ALCAM-Morphanten. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die rot markierten Transkripte der Abbildung 26A, die eine signifikante Regulation (mind. zweifach, $p < 0,05$) aufweisen.

Proteinname	Genname	p-Wert	FC Alc-MO/WT (log ₂)
Opsin 1 (cone pigments), medium-wave-sensitive, 1	opn1mw1	0,000144	-4,74
Phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone	pde6c	0,000353	-4,14
Opsin 1 (cone pigments), short-wave-sensitive 1	opn1sw1	0,000145	-4,10
Guanine nucleotide binding protein (G protein) 3b	gnb3b	0,000414	-4,01
Phosducin b	pdcb	0,000677	-3,64
Opsin 1 (cone pigments), short-wave-sensitive 2	opn1sw2	0,000510	-3,63
zgc:73359 (Retinal cGMP phosphodiesterase)	zgc:73359	0,000510	-3,60
zgc:73075 (Recoverin)	zgc:73075	0,002383	-3,47
Guanine nucleotide binding protein (G protein) 2	gnat2	0,000877	-3,45
Rhodopsin	rho	0,002619	-2,49
Arrestin 3, retinal (X-arrestin), like	arr3l	0,002619	-2,30
Guanine nucleotide binding protein (G protein) 1	gngt1	0,003510	-2,20
Interphotoreceptor retinoid-binding protein	irbp	0,000510	-2,05
Retinal pigment epithelium-specific protein 65a	rpe65a	0,003510	-1,89
Guanine nucleotide binding protein (G protein) 2a	gngt2a	0,016642	-1,71
Retinol binding protein 4, like	rbp4l	0,003510	-1,63
Guanine nucleotide binding protein (G protein) 1	gnat1	0,013409	-1,56
Retinol binding protein 2a, cellular	rbp2a	0,009389	-1,34
Neurogenin 1	neurog1	0,004837	1,06
Paired box gene 6a	pax6a	0,064723	1,00
Cone-rod homeobox	crx	0,105116	1,07
Atonal homolog 7	atoh7	0,035185	1,10
SRY-box containing gene 11b	sox11b	0,017087	1,24
Crystallin, alpha A	cryaa	0,007242	1,25
Orthodenticle homolog 5	otx5	0,014458	1,31
Crystallin, gamma M2d12	crygm2d12	0,011588	1,39
Visual system homeobox 1 homolog	vsx1	0,089710	1,46
Crystallin, gamma MX, like 2	crygmxl2	0,014162	1,74
Crystallin, beta A4	cryba4	0,003096	2,70
zgc:153846 (Crystallin, gamma M1)	zgc:153846	0,007248	1,49

Tabelle 5.: Der Vergleich beider SILAC-Studien von ALCAM-Morphanten als Gesamt-Embryonen und Herz-Isolaten. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die rot gekennzeichneten Kandidaten im Streudiagramm in der Abbildung 27. Angegeben werden die direkten Ratios (\log_2) zwischen Wildtypen (WT) und ALCAM-Morphanten (Alc-MO) der Gesamt-Embryonen und der Herzsolierung.

Proteinname	Gencode	Alc-MO/WT Embryo	Alc-MO/WT Herz
Carbonic anhydrase	cahz	-0,12	-3,34
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gapdhs	-0,59	-3,21
Embryonic globin alpha a3	hbae3	-0,34	-2,72
Novel protein similar to vertebrate paralemmin (PALM)	zgc:63523	-0,54	-2,46
Embryonic globin beta e2	hbbe2	0,06	-2,27
Thioredoxin domain containing 5	txndc5	-0,35	-1,69
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide a	ywhaqa	-0,11	-1,68
FK506 binding protein 9	fkbp9	-0,18	-1,58
Transferrin-a	tfa	0,30	-1,50
Integrin beta	itgb1b	-0,39	-1,44
Malic enzyme	me3	0,00	-1,43
Parvalbumin 4	pvalb4	-0,28	-1,36
Fructose-1,6-bisphosphatase 1b	fbp1b	0,34	-1,33
Heat shock protein 90, beta, member 1	hsp90b1	-0,09	-1,12
Annexin	anxa5b	0,10	-1,12
Spectrin, beta, erythrocytic	sptb	0,01	1,03
Basal cell adhesion molecule	bcam	-0,25	1,03
Myosin, light polypeptide 9, regulatory	myl9b	0,00	1,07
Novel protein similar to vertebrate filamin C, gamma	fncb	0,24	1,16
Annexin	anxa2a	0,49	1,18
ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2a	atp2a2a	0,00	1,20
Cardiac muscle myosin heavy chain 6 alpha	myh6	-0,03	1,59
Myosin light chain 2	mylz2	-0,25	1,70
Cardiac troponin T	tnnt2a	0,00	1,90
Muscle cofilin 2	cfl2l	-0,06	1,95
Uncharacterized protein (Tropomyosin)	tpm2	0,28	3,44
Novel protein similar to vertebrate tropomyosin 4	tpm4	0,00	3,85

Tabelle 6.: Gegenüberstellung der herzspezifischen Transkriptom- und Proteomstudie von ALCAM-Morphanten. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die rot gekennzeichneten Kandidaten im Streudiagramm in der Abbildung 28. Angegeben wird die Expression (\log_2) der Kandidaten auf Protein- und Transkriptebeine in den ALCAM-Morphanten im Vergleich zu Wildtypen.

C. Tabellen

Proteinname	Genname	Alc-MO/WT mRNA	Alc-MO/WT Protein
Carbonic anhydrase	cahz	-0,71	-3,34
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gapdhs	-0,39	-3,21
Embryonic globin alpha a3	hbae3	-0,44	-2,72
Novel protein similar to vertebrate paralemmin (PALM)	zgc:63523	-0,17	-2,46
Embryonic globin beta e2	hbbe2	-1,17	-2,27
Thioredoxin domain containing 5	txndc5	-0,70	-1,69
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide a	ywhaqa	-0,21	-1,68
FK506 binding protein 9	fkbp9	-0,50	-1,58
Transferrin-a	tfa	-0,93	-1,50
Malic enzyme	me3	-0,49	-1,43
Parvalbumin 4	pvalb4	-0,49	-1,39
Fructose-1,6-bisphosphatase 1b	fbp1b	-0,44	-1,33
Zgc:136930 protein	zgc:136930	-1,02	-1,23
Heat shock protein 90, beta, member 1	hsp90b1	-0,62	-1,12
Annexin	anxa5b	-0,70	-1,12
EH-domain containing 1	ehd1b	-0,76	-0,97
Fructose-bisphosphate aldolase C-B	aldocb	-1,57	-0,44
Myoglobin	mb	-1,01	-0,24
Zgc:110679	myl10	2,54	0,22
Major vault protein	mvp	1,15	0,78
Spectrin, beta, erythrocytic	sptb	0,62	1,03
Smarca4 protein	smarca4	0,51	1,05
Annexin	anxa2a	0,75	1,18
Myosin light chain 2	mylz2	0,84	1,70
Cardiac troponin T	tnnt2a	0,55	1,90

Tabelle 7.: Ergebnisse der quantitativen Proteomstudie von Kardiomyozyten im Alter von 22 Monaten. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die rot markierten Proteine der Abbildung 32.

Proteinname	Genname	Uniprot	p-Wert	FC 22M/2M (log ₂)
Histone H2B type 1-P	Hist1h2bp	Q8CGP2	0,041429	-2,12
Transmembrane protein 35	Tmem35	Q9D328	0,037337	-2,06
Lamina-associated polypeptide 2	Lap2	Q61029	0,002701	-0,87
Gelsolin	Gsn	P13020	0,014652	-0,85
Eukaryotic translation initiation factor 4	Eif4g1	Q6NZJ6	0,020861	-0,67
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	Idh2	P54071	0,032198	0,60
Acyl-CoA dehydrogenase family member 11	Acad11	Q80XL6	0,013907	0,75
Vimentin	Vim	P20152	0,032428	0,78
Oxidoreductase HTATIP2	Htatip2	Q9Z2G9	0,009268	0,99
Long-chain acyl-CoA synthetase 6	Acsl6	Q91WC3	0,026616	1,24
Glutathione S-transferase A1	Gsta1	P13745	0,021181	4,15
(S)-3-amino-2-methylpropionate transaminase	Abat	P61922	0,006725	4,49

Tabelle 8.: Ergebnisse der quantitativen Proteomstudie von Kardiomyozyten im Alter von 30 Monaten. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die rot markierten Proteine der Abbildung 34.

Proteinname	Genname	Uniprot	p-Wert	FC 22M/2M (log ₂)
Four and a half LIM domains protein 2	Fhl2	O70433	0,003640	-1,20
Transferrin receptor protein 1	Tfrc	Q62351	0,038810	-1,19
Mitochondrial uncoupling protein 3	Ucp3	P56501	0,011166	-1,07
Putative myosin light chain kinase 3	Mylk3	Q3UIZ8	0,020107	-0,98
Aldehyde dehydrogenase family 1 member B1	Aldh1b1	Q9CZS1	0,0041517	-0,70
Perilipin-2	Plin2	P43883	0,040381	-0,69
Ezrin	Ezr	P26040	0,000521	-0,69
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	Fkbp4	P30416	0,011179	-0,66
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	Ppif	Q99KR7	0,001294	-0,62
Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B' subunit alpha	Ppp2r3a	B2RXC8	0,002882	-0,62
Echinoderm microtubule-associated protein-like 1	Eml1	Q05BC3	0,020603	-0,62
Methylmalonic aciduria type A homolog, mitochondrial	Mmaa	Q8C7H1	0,014413	-0,62
Serpin H1	Serpinh1	P19324	0,020119	-0,61
C-Myc-binding protein	Mycbp	Q9EQS3	0,047802	-0,60
Glutathione S-transferase A4	Gsta4	P24472	0,000197	0,60
Lamin-B2	Lmnb2	P21619	0,000550	0,61
Desmoglein 2	Dsg2	A2RRJ0	0,002856	0,62
Glutathione S-transferase Mu 1	Gstm1	P10649	0,005062	0,64
Sulfated glycoprotein 1	Psap	Q61207	0,001164	0,65
Cytochrome b5	Cyb5a	P56395	0,006604	0,67
Kynurenine-oxoglutarate transaminase 3	Ccbl2	Q71RI9	0,013331	0,72
Catenin beta-1	Ctnnb1	Q02248	0,047913	0,74
Amine oxidase [flavin-containing] B	Maob	Q14CG9	0,029130	0,74
Calumenin, isoform CRA-b	Calu	Q6XLQ8	0,007705	0,79
Putative uncharacterized protein	Lpl	Q3U831	0,021913	0,84
Dehydrogenase/reductase SDR family member 7C	Dhrs7c	Q8CHS7	0,000074	0,85
Thiamine-triphosphatase	Thtpa	Q8JZL3	0,019019	0,87
Cathepsin B	Ctsb	P10605	0,000539	0,91
Glutathione S-transferase Mu 2	Gstm2	P15626	0,000162	0,98
Calumenin	Calu	O35887	0,022315	1,12
Cathepsin D	Ctsd	P18242	0,000012	1,16
NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	Nnt	Q61941	0,001641	1,20
Azoreductase	Dia4	Q64669	0,000447	1,28
Epoxide hydrolase 1, microsomal	Eph1	P97869	0,010834	2,00
3-hydroxybutyrate dehydrogenase	Bdh1	A1E283	0,0000003	3,48
Myosin-7	Myh7	Q91Z83	0,029659	4,13

D. Veröffentlichungen

D.1. Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der Dissertation

Journalbeitrag

A. Konzer, A. Ruhs, H. Braun, B. Jungblut, T. Braun, M. Krüger

Stable isotope labelling in zebrafish allows in vivo monitoring of cardiac morphogenesis.

Mol Cell Proteomics (In Revision)

Konferenzbeiträge

A. Konzer, H. Braun, B. Jungblut, T. Braun, M. Krüger

SILAC zebrafish enables in vivo monitoring of cardiac morphogenesis.

Posterpräsentation, 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Denver, USA (2011)

A. Konzer, H. Braun, B. Jungblut, T. Braun, M. Krüger

Analysis of the cardiac proteome during embryonic development by the SILAC zebrafish.

Posterpräsentation, 1st International Symposium of the Excellence Cluster Cardio

Pulmonary System (ECCPS), Bad Nauheim, Germany (2010)

A. Konzer, A. Ruhs, M. Wiesnet, H. Drexler, P. Gellert, T. Braun, M. Krüger

In vivo monitoring of complex, aged related changes in the heart at the protein level using the SILAC mouse.

Posterpräsentation, Proteomic Forum, Berlin, Germany (2009)

D.2. Über das Dissertationsthema hinausgehende Veröffentlichungen

Journalbeiträge

H.C. Drexler, A. Ruhs, A. Konzer, L. Mendler, M. Bruckskotten, M. Looso, S. Günther, T. Boettger, M. Krüger, T. Braun

On marathons and sprints: an integrated quantitative proteomics and transcriptomics analysis of differences between slow and fast muscle fibers.

Mol Cell Proteomics 11, M111.010801 (2012)

M. Studencka, A. Konzer, G. Moneron, D. Wenzel, L. Opitz, G. Salinas-Riester, C. Bedet, M. Krüger, S.W. Hell, J.R. Wisniewski, H. Schmidt, F. Palladino, E. Schulze, M. Jedrusik-Bode

Novel roles of Caenorhabditis elegans heterochromatin protein HP1 and linker histone in the regulation of innate immune gene expression.

Mol Cell Biol. 32(2):251-65. (2011)

M. Bruckskotten, M. Looso, F. Cemic, A. Konzer, J. Hemberger, M. Krüger, T. Braun
PCA2GO: a new multivariate statistics based method to identify highly expressed GO-Terms.

BMC Bioinformatics. 11:336. (2010)

Buchkapitel

A. Konzer, A. Ruhs, T. Braun, M. Krüger

Global protein quantification of mouse heart tissue based on the SILAC mouse.

Methods in Molecular Biology, Humana Press (accepted)

E. Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Personen beigetragen, denen ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen möchte:

In erster Linie bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Braun für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Institut anzufertigen sowie für die hilfreiche Unterstützung während dieser Zeit. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Clauss für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Ein großer Dank gilt Dr. Marcus Krüger für die lehrreichen 4 Jahre in seinem Massenspektrometrie-Labor, für die hilfreiche Unterstützung und Beratung sowie für die anregenden Diskussionen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Sylvia Jeratsch für die vielen schönen Stunden im und außerhalb des Labors, für die tatkräftige und moralische Unterstützung bei all den tropfenden und dichten Säulen, defekten Massenspektrometern und den Momenten, wenn mal wieder gar nichts ging.

Bei meinen Mädels im Labors und meinen Jungs am PC möchte ich mich für die schöne Arbeitsatmosphäre und hilfreiche Unterstützung bedanken. Danke Sylvia, Sabrina, Aaron, Mario, Pascal, Marc, Soraya, Sriram und Ellen. Besonders danke ich Sabrina für die Spaziergänge zum Altbau und Sriram für die köstlichste Mango dieser Welt.

Weiterhin gilt ein besondere Dank Monika Müller-Boche für die Versorgung, Pflege und Verpaarung meiner Fische, sowie für die tatkräftige Unterstützung bei den immer wiederkehrenden Futtertests. Des Weiteren bedanke ich mich bei Marion Wiesnet für die Isolierung der Maus-Kardiomyozyten und bei Sylvia Thomas für die Durchführung der Microarrays. Ein großer Dank gilt Helene Braun für die Hilfestellungen bei den Morpholino-

Injektionen und dafür, dass Sie immer mein Ansprechpartner für alle Zebrafischbelange war.

Allen Mitarbeitern unserer Abteilung möchte ich danken für die hilfreichen Ratschläge, Hinweise und Beantwortung aller Fragen. Meiner IMPRS-Klasse von 2008 danke ich für einen unvergesslichen Aufenthalt in Rauischholzhausen sowie für den gemeinsamen Weg, den wir gegangen sind. Danke an Katha, Judith, Carina, Hagen, Luca, Swati und Johannes. Allen Doktoranden im Haus wünsche ich eine erfolgreiche Promotion.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie: Danke Mama und Papa, dass Ihr mich immer unterstützt und an mich geglaubt habt. Danke Bork, dass Du mich immer wieder aufgebaut und motiviert hast. Du hast meine kleinen Dramen geduldig ertragen und mir immer beiseite gestanden. Ich weiß nicht, wo ich heute ohne Dich wäre... Danke für alles!