

UNIVERSITÄT LEIPZIG

Medizinische Fakultät



Bernburg
Dessau
Köthen



Hochschule Anhalt
Anhalt University of Applied Sciences

**Fachbereich Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik**

Funktionelle Charakterisierung von *mtch2* im Zebrafischmodell

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (Biotechnologie)

Ariane Strobach

Matrikelnummer: 4049774

Studiengang: Biotechnologie

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Mägert

2. Gutachter: Prof. Dr. Antje Körner

Datum der Abgabe: 19.06.2015

Abstract

Die steigende Zahl von Erkrankungen in Folge von Adipositas ist ein weltweites Gesundheitsproblem unserer Zeit. Genomweite Assoziationsstudien konnten *single-nucleotide polymorphisms* identifizieren, die in Zusammenhang mit Adipositas stehen könnten, darunter auch *MTCH2*. Weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, dass *MTCH2* eine regulatorische Rolle bei der Adipogenese einnimmt. Da *mtch2* auch im Zebrafisch in verschiedenen Geweben und Organen wie Leber, Darm und Fettgewebe exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass es in diesen Organen und Geweben eine Funktion aufweist. Diese Funktion sollte über einen Morpholino-induzierten *Knockdown* des Gens und die Analyse des Phänotyps der Morpholino-injizierten Fische näher analysiert werden. Der *Knockdown* von *mtch2* im Zebrafisch wurde mit Hilfe zweier *Splice*-Morpholinos induziert und über quantitative *Real Time* PCR identifiziert. Die Auswirkungen des *Knockdowns* auf die Entwicklung von Leber und Darm der Fische wurde über spezifische Marker mit der Methode der *In situ* Hybridisierung untersucht. Die Adipozytenbildung wurde durch Nilrotfärbung analysiert und über die Fütterung der Fische mit fluoreszierenden *Beads* mit dem Essverhalten in Zusammenhang gebracht. Bei beiden Morpholinos führte der *Knockdown* von *mtch2* an Tag 4 der Entwicklung der Morpholino-injizierten Zebrafische zu Auffälligkeiten in der Ausbildung von Leber und Darm der Fische, die aber nicht mit einer generellen Störung der Entwicklung der Tiere einherging. An Tag 8 der Entwicklung der Zebrafische zeigte sich hingegen, dass die Tiere im Gegensatz zu den Kontroll-injizierten Fischen insgesamt kleiner beziehungsweise unterentwickelt waren, wobei dieser Umstand nicht mit ihrem Essverhalten in Zusammenhang gebracht werden konnte. Zudem konnte eine reduzierte Adipozytenbildung in den Morpholino-injizierten Zebrafischen festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass *mtch2* eine Rolle bei der Ausbildung von Darm und Leber im Zebrafisch spielt und damit möglicherweise indirekt an der generellen Entwicklung sowie der Fettgewebsentwicklung der Fische beteiligt ist.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung.....	11
1.1 Adipositas	11
1.2 Bedeutung von <i>MTCH2</i> bei Adipositas.....	12
1.3 Bedeutung von <i>MTCH2</i> bei der Apoptose	16
1.4 Der Zebrafisch als Modellorganismus	17
1.5 <i>mtch2</i> im Zebrafisch	18
1.6 Gen- <i>Knockdown</i> durch Morpholinoinjektion	20
2 Zielstellung	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Zebrafischanlage PP-Modul AQUA Schwarz GmbH	27
3.2 Etablierung des <i>Knockdowns</i> von <i>mtch2</i>	27
3.2.1 Verpaarung der Zebrafische	27
3.2.2 Mikroinjektion der Morpholinos	28
3.2.3 Isolation der Gesamt-RNA aus Zebrafisch-Embryonen	29
3.2.4 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase	29
3.2.5 Überprüfung des <i>Knockdowns</i>	30
3.3 Analyse des Phänotyps	33
3.3.1 Fotodokumentation	33
3.3.2 <i>In situ</i> Hybridisierung	34
3.3.3 Messung der genspezifischen Marker mit qRT-PCR	38

3.3.4	Feeding behaviour	39
3.3.5	Nilrot-Färbung.....	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Etablierung des <i>Knockdowns</i> von <i>mtch2</i>	40
4.2	Bewertung des Phänotyps der MO-injizierten Fische.....	41
4.3	Auswirkungen des <i>Knockdowns</i> von <i>mtch2</i> auf Leber und Darm.....	44
4.3.1	Herstellung und Überprüfung der DIG-markierten RNA-Sonden	44
4.3.2	Etablierung <i>In situ</i> Hybridisierung	45
4.3.3	Auswirkungen der MO-Injektionen auf die <i>fabp2</i> -Expression	46
4.3.4	Auswirkung der MO-Injektion auf die <i>fabp10</i> und <i>I-fabp</i> -Expression.....	47
4.4	Adipozytenentwicklung.....	49
4.5	Augendurchmesser	50
4.6	Essverhalten der Fischlarven	51
5	Diskussion	53
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	58
	Literaturverzeichnis	60
	Quellenverzeichnis	64
	Danksagung	66
	Eidesstattliche Erklärung	67
	Anhang	68

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µS	Mikrosiemens
5'-UTR	5' untranslatierter Bereich
A	Adenosin
as	<i>antisense</i>
a.d.	destilliertes Wasser
<i>BAK</i>	<i>Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer</i>
<i>BAX</i>	<i>Bcl-2-like protein 4</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
<i>BCL2</i>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Ca(NO ₃) ₂	Calciumnitrat
cDNA	<i>complementary</i> , komplementäre DNA
ctrl	Kontrolle
d	Tag
dd	<i>double distilled</i> , 2-fach destilliert
DIG	Digoxigenin
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Deoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>fabp2</i>	<i>Fatty acid-binding protein 2</i>
<i>fabp10</i>	<i>Fatty acid-binding protein 10a</i>
FAM	Fluorescein
fw	<i>forward</i>
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HM	Hybridisierungsmix
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
L	Liter
<i>l-fabp</i>	<i>Liver-type fatty acid-binding protein</i>
M	Marker
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mM	millimolar
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
MO	Morpholino
mRNA	<i>messenger</i> , Boten-RNA
<i>mtch2</i>	<i>Mitochondrial carrier homolog 2</i>
<i>myoD</i>	Myogener Faktor 3
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat

NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
rv	<i>reverse</i>
s	<i>sense</i>
SGBS	Simpson-Golabi-Behmel Syndrom
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SSC	<i>Saline-sodium citrate buffer</i>
T	Thymin
TAE	TrisAcetat-EDTA
TAMRA	Tetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>tBID</i>	<i>"truncated" BH3 interacting domain death agonist</i>
<i>TNF</i>	Tumornekrosefaktor
tRNA	Transfer-RNA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
vol	Volumen
zf	Zebrafisch

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Rolle von <i>MTCH2</i> bei der Adipozytenreifung und seine Expression in viszeralem und subkutanem Fettgewebe [Bernhard, 2013].....	13
Abbildung 2: <i>MTCH2</i> -Expression schlanker und übergewichtiger Patienten sowie bei der Adipozytenreifung [Kulyté, 2011].....	14
Abbildung 3: Expression von <i>MTCH2</i> in ZL- und ZDF-Ratten [Schmid, 2012]	15
Abbildung 4: Ablauf der Apoptose [Clarke/Tyler, 2009]	17
Abbildung 5: Der Zebrafisch	18
Abbildung 6: Konservierung von <i>Mtch2</i> im Zebrafisch.....	19
Abbildung 7: Expression von <i>mtch2</i> im Zebrafisch	19
Abbildung 8: Nachweis der <i>mtch2</i> -Expression durch <i>In situ</i> Hybridisierung	20
Abbildung 9: Struktur von DNA und Morpholino [Corey/Abrams, 2001]	21
Abbildung 10: Lage der <i>zfmtch2</i> -Primer und Morpholinos im Gen	30
Abbildung 11: DNA-Vervielfältigung mittels PCR.....	31
Abbildung 12: Prinzip der <i>TaqMan</i> -Sonden.....	32
Abbildung 13: DNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR	33
Abbildung 14: Orientierung der Gene <i>fabp2</i> und <i>fabp10</i> im Vektor	34
Abbildung 15: DNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR	38
Abbildung 16: <i>mtch2</i> -Expression nach Morpholino-Injektion	40
Abbildung 17: Auswertung des <i>mtch2</i> -Knockdowns über Agarosegelelektrophorese	41
Abbildung 18: Phänotyp <i>mtch2</i> MO1 im Vergleich zum Kontroll-MO.....	42
Abbildung 19: Phänotyp <i>mtch2</i> MO2 im Vergleich zum Kontroll-MO.....	42
Abbildung 20: Unspezifischer Phänotyp der mit MO2 injizierten Fische	43
Abbildung 21: Vergleich der Absterberaten der Fische bei beiden Morpholinos.....	44
Abbildung 22: Etablierung der RNA-Sonden für die <i>In situ</i> Hybridisierung	45
Abbildung 23: Etablierung der <i>In situ</i> Hybridisierung.....	46
Abbildung 24: <i>In situ</i> Hybridisierung <i>fabp2</i>	47
Abbildung 25: <i>In situ</i> Hybridisierung <i>fabp10</i>	48
Abbildung 26: <i>fabp10</i> - und <i>l-fabp</i> -Expression <i>mtch2</i> MO1	49
Abbildung 27: <i>fabp10</i> - und <i>l-fabp</i> -Expression <i>mtch2</i> MO2	49
Abbildung 28: Adipozytenanzahl <i>mtch2</i> MO- und Kontroll- MO-injizierter Fischlarven	50
Abbildung 29: Augendurchmesser MO- und Kontroll-MO-injizierter Fischlarven	51

Abbildung 30: Essverhalten MO- und Kontroll-MO-injizierter Fischlarven 52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien 23

Tabelle 2: Verwendete Morpholinos 25

Tabelle 3: Verwendete Primer und Sonden 25

Tabelle 4: Verwendete Enzyme (E) und Antikörper (A) 26

Tabelle 5: Verwendete Plasmide 26

Tabelle 6: Polymerasen und Restriktionsenzyme für die Herstellung der RNA-Sonden
..... 35

1 Einleitung

1.1 Adipositas

Die Fettgewebsentwicklung und Adipozytendifferenzierung bei Kindern gehören zu den Forschungsschwerpunkten der Arbeitsgruppe Körner am Pädiatrischen Forschungszentrum der Universitätsklinik Leipzig. Der Prozess der Zelldifferenzierung, bei dem sich Präadipozyten zu Adipozyten entwickeln, wird Adipogenese genannt [Birbrair, 2013] und stellt einen entscheidenden Prozess bei der Anhäufung von Adipozyten dar. Während die physiologische Entwicklung des Fettgewebes beim Menschen essentiell für einen gesunden metabolischen und kardiovaskulären Zustand ist, führt die pathologische Zunahme von Fettgewebe bei Kindern und Jugendlichen zu Übergewicht, das in krankhaften Veränderungen des Gesundheitszustandes resultieren kann.

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat sich die Zahl der übergewichtigen und adipösen Menschen seit 1980 weltweit verdoppelt und wird weiter steigen. Im Jahr 2014 waren mehr als 1,9 Billionen Erwachsene übergewichtig, darunter 600 Millionen adipös. Zunehmend sind auch Kinder betroffen. So lag im Jahr 2013 die Zahl der übergewichtigen oder adipösen Kinder im Alter unter fünf Jahren weltweit bei 42 Millionen [WHO, 2015] und auch in Deutschland sind 15 % der Kinder im Alter von 3-17 Jahren von Übergewicht betroffen, 6,3 % sogar adipös [Kurth, 2007]. Übergewicht und Adipositas werden definiert als eine exzessive Fettakkumulation, die mit ernsthaften gesundheitlichen Folgen verbunden ist. Die Ursachen von Adipositas sind vielseitig. Zum einen kann ein Ungleichgewicht zwischen aufgenommener und verbrauchter Energie, welches besonders beim Verzehr von energiedichten Lebensmitteln mit viel Fett und Zucker auftritt, zur Entstehung beitragen. Zum anderen wird die Urbanisierung und die damit verbundene verminderte körperliche Aktivität als Ursache gesehen [WHO, 2015]. Neben der Umwelt, soziokulturellen, psychologischen und metabolischen Faktoren tragen aber auch genetische Faktoren zur Entstehung von Adipositas bei [Raj/Kumar, 2010]. Schätzungen zufolge werden etwa 50 % der Tendenz zu Adipositas vererbt [Kiess, 2001]. Dabei ist Adipositas meist polygenetisch bedingt, so dass höchstwahrscheinlich mehr als einhundert Polygene bei der Regulation des Körpergewichts eine Rolle spielen. Polygenetische Adipositas ist dabei üblicherweise

das Resultat aus dem Zusammenspiel solcher Gene und deren Interaktion mit zu Adipositas prädisponierenden Umweltfaktoren [Hebebrand, 2010]. Die gesundheitlichen Folgen von Adipositas sind erheblich. Ein erhöhter BMI steigert das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (vor allem Herzerkrankungen), Diabetes, Muskel-Skelett-Krankheiten (Arthrose) und einige Krebserkrankungen (Kolon, Endometrium, Brust) [WHO, 2015]. Adipöse Kinder haben bereits im Kindesalter und später im Erwachsenenalter ein erhöhtes Risiko für Atemschwierigkeiten, Frakturen, Bluthochdruck, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2, Fettleber mit dem Risiko für Steatohepatitis und Leberzirrhose, das metabolische Syndrom, z.B. mit Insulinrestistenz, und auch den frühzeitigen Tod [WHO, 2015; Abrams, 2011]. Die häufigsten Folgen kindlicher Adipositas sind dabei Bluthochdruck, Dyslipidämie, Rückenschmerzen und psychosoziale Probleme [Kiess, 2001].

1.2 Bedeutung von *MTCH2* bei Adipositas

Wie oben schon erwähnt, handelt es sich bei Adipositas um eine polygenetische Erkrankung. Bei den mutmaßlichen Polygenen handelt es sich unter anderem um *NEGR1*, *TMEM18* und *MTCH2* [Hebebrand, 2010]. Die Auswahl von Kandidatengenen, die im Zusammenhang mit Übergewicht stehen können, erfolgt über genomweite Assoziationsstudien [Bernhard, 2013]. Dabei werden jedoch nicht einzelne Gene identifiziert, sondern so genannte *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs), die in Assoziation mit einer Krankheit bzw. dem dazugehörigen Phänotypen stehen. Sie liegen daher nicht zwangsläufig in einer Protein-codierenden Region, sondern zudem in nicht-codierenden Regionen zwischen zwei Genen oder auf Introns [Feero, 2010]. Der so erhaltene korrelative Zusammenhang kann erst nach der Identifizierung solcher Kandidaten-Gene mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden in kausalen Zusammenhang gebracht werden [Begum, 2012]. Bernhard *et al* untersuchten acht Gene, darunter *MTCH2*, hinsichtlich ihrer Effekte in der Adipogenese, ihrer Regulation durch metabolische Agenzien in Adipozyten und Präadipozyten und der Expression in humanen Fettzellen [Bernhard, 2013]. *MTCH2*, auch bekannt unter den Namen *MIMP* oder *HSPC032*, steht für *Mitochondrial carrier homolog 2*, es handelt sich also um ein mitochondriales Membranprotein mit einer Größe von 303 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 33 kDa [<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y6C9>]. Es konnte eine zweifache

Hochregulierung von *MTCH2* während der Adipogenese gezeigt werden. Zudem inhibierte ein Knockdown von *MTCH2* in Präadipozyten die Adipozytenreifung. Des Weiteren konnte eine höhere Expression im subkutanem als im viszeralen Fettgewebe nachgewiesen werden, wobei die Expression im subkutanen Fettgewebe bei übergewichtigen Patienten signifikant höher war, als bei nicht-übergewichtigen Patienten (Abbildung 1).

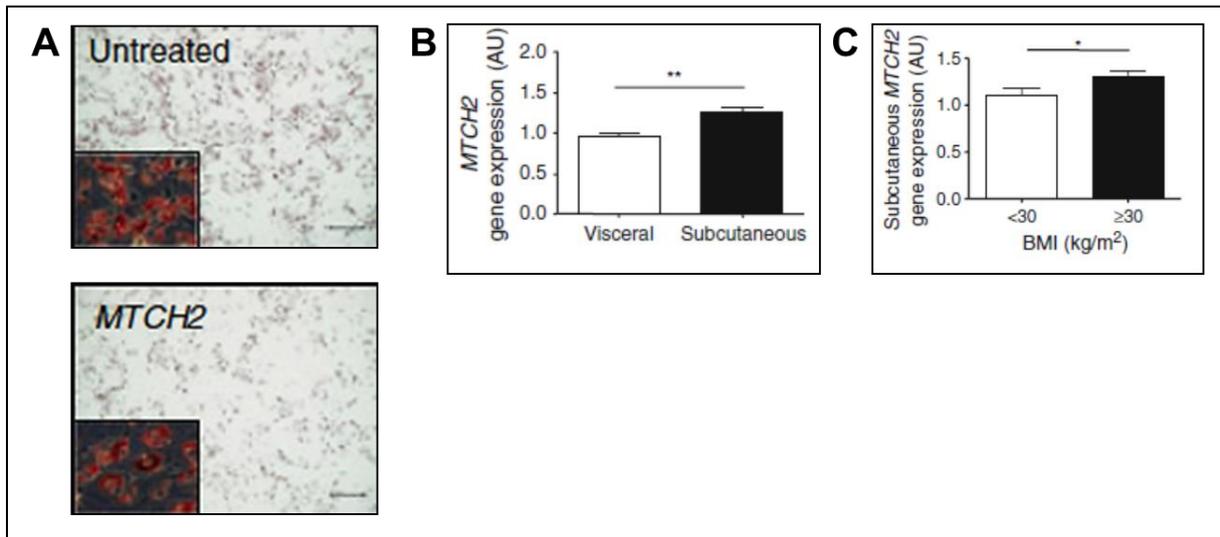


Abbildung 1: Die Rolle von *MTCH2* bei der Adipozytenreifung und seine Expression in viszeralem und subkutanem Fettgewebe [Bernhard, 2013]

A: Inhibierung der Adipozytenreifung nach *MTCH2*-Knockdown in Präadipozyten, **B:** Erhöhte *MTCH2*-Expression in subkutanem Fettgewebe, **C:** Erhöhte *MTCH2*-Expression in subkutanem Fettgewebe bei adipösen Patienten verglichen mit schlanken Patienten

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *MTCH2* eine regulatorische Rolle bei der Adipozytendifferenzierung einnimmt [Bernhard, 2013]. Kulyté *et al* konnten zeigen, dass *MTCH2*, neben sieben weiteren untersuchten Genen, im Fettgewebe am höchsten exprimiert wurde. Des Weiteren zeigten übergewichtige Frauen höhere *MTCH2*-mRNA-Level im weißen Fettgewebe verglichen mit nichtübergewichtigen Patienten. Die *MTCH2*-mRNA-Level waren in isolierten Adipozyten übergewichtiger Patienten verglichen mit schlanken Patienten ebenfalls erhöht, auch während der Adipozytendifferenzierung konnte ein Anstieg der Expression gezeigt werden. Zudem konnte eine positive Korrelation der *MTCH2*-Expression im weißen Fettgewebe mit dem BMI festgestellt werden (Abbildung 2).

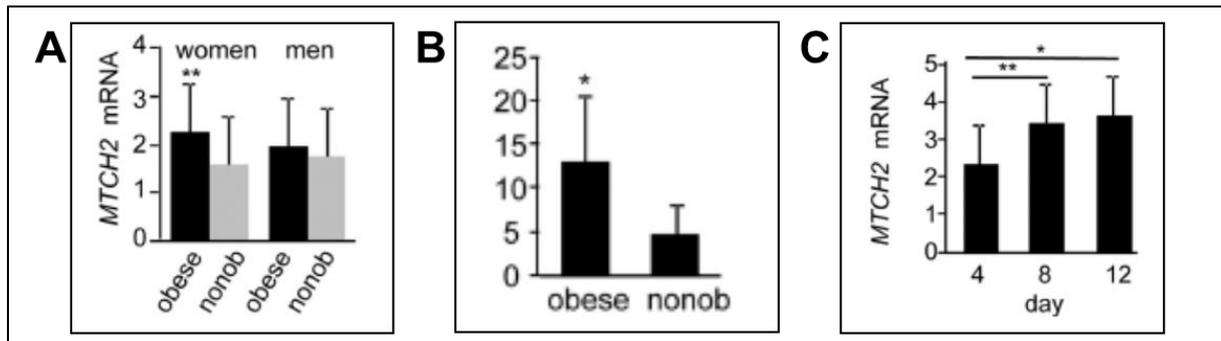


Abbildung 2: *MTCH2*-Expression schlanker und übergewichtiger Patienten sowie bei der Adipozytenreifung [Kulyté, 2011]

A: Übergewichtige Frauen zeigen höhere *MTCH2*-mRNA-Level, B: Erhöhte *MTCH2*-Expression in Adipozyten übergewichtiger Patienten, C: Anstieg der *MTCH2*-Expression während der Adipozytenreifung

Kulyté *et al* kommen damit zu dem Schluss, dass die gestörte Kontrolle der Bildung neuer Fettzellen, die bei Adipositas erhöht ist, ein Mechanismus ist, bei dem *MTCH2* eine Rolle spielen könnte. Zudem könnte *MTCH2* teilweise die Anfälligkeit für Adipositas beeinflussen, indem es die Funktion der Adipozyten verändert [Kulyté, 2011]. Das Fettgewebe ist folglich nicht nur für die Energiespeicherung verantwortlich, sondern stellt auch einen Schlüsselregulator für das Körpergewicht [Shin, 2009; Trayhurn, 2006] und damit den Ort, an dem die für Adipositas relevanten Gene wirken dar [Schmid, 2012]. Fütterungsversuche in Mäusen und Ratten helfen dabei, die Expression von Kandidatengenen in weiteren Geweben sowie in Hypothalamus und Gehirn zu untersuchen [Schmid, 2012; Yoganathan, 2012]. Der Hypothalamus gilt dabei als regulatorisches Zentrum für das Energiegleichgewicht und die Nahrungsaufnahme [Coll, 2007]. Für einige Gene konnte bereits gezeigt werden, dass sie die Energiehomöostase regulieren oder dass sie im zentralen Nervensystem exprimiert werden [Willer, 2009]. Schmid *et al* untersuchten unter anderem die Expression von *MTCH2* in verschiedenen Geweben und im Hypothalamus von *Zucker diabetic fatty rats* (ZDF) und *Zucker lean rats* (ZL) (Abbildung 3). Beide Gruppen zeigten hohe Expressionen von *MTCH2* im Hypothalamus, was darauf hindeutet, dass *MTCH2* an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt ist. Da diese erhöhte Expression jedoch bei beiden Gruppen auftrat, kann nicht darauf geschlossen werden, dass *MTCH2* den Phänotyp der ZDF-Ratten und damit das Übergewicht direkt verantwortet [Schmid, 2012]. Die erhöhte Expression von *MTCH2* im Hypothalamus konnte zudem in gefütterten Mäusen, verglichen mit gefasteten Mäusen gezeigt werden. Dabei stellte *MTCH2* das einzige Gen dar, das diese Expressions-Erhöhung im Hypothalamus auch bei

Mäusen, die mit einer Hochfett-Diät gefüttert wurden, zeigte [Yoganathan, 2012]. Neben dem Hypothalamus gibt es viele andere Regionen des Gehirns, die ebenfalls für die Regulation von Nahrungsaufnahme und Energiegleichgewicht verantwortlich sind [Lenard, 2008]. Dort konnten jedoch keine Unterschiede in der *MTCH2*-Genexpression festgestellt werden [Yoganathan, 2012]. Die Expression von *MTCH2* war bei ZL- und ZDF-Ratten im mesenterialem Fettgewebe am geringsten. In den ZDF-Tieren waren die Expressionen im Nierenfett, subkutanem Fett und Hypothalamus gleich hoch, nur in den ZL-Ratten war die Expression im subkutanen Fettgewebe niedriger als in Nierenfettgewebe und Hypothalamus (Abbildung 3). Beim Vergleich beider Tiergruppen untereinander war die Expression von *MTCH2* bei den ZDF-Tieren im subkutanen und mesenterialem Fett signifikant höher [Schmid, 2012]. Das mesenteriale Fettgewebe beherbergt dabei das hohe Risiko für die Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 und Arteriosklerose [Hajer, 2008]. Im Fettgewebe der Mäuse zeigte sich ebenfalls die veränderte Expression von *MTCH2* in Form einer achtfach höheren Expression bei gefütterten Mäusen [Yoganathan, 2012].

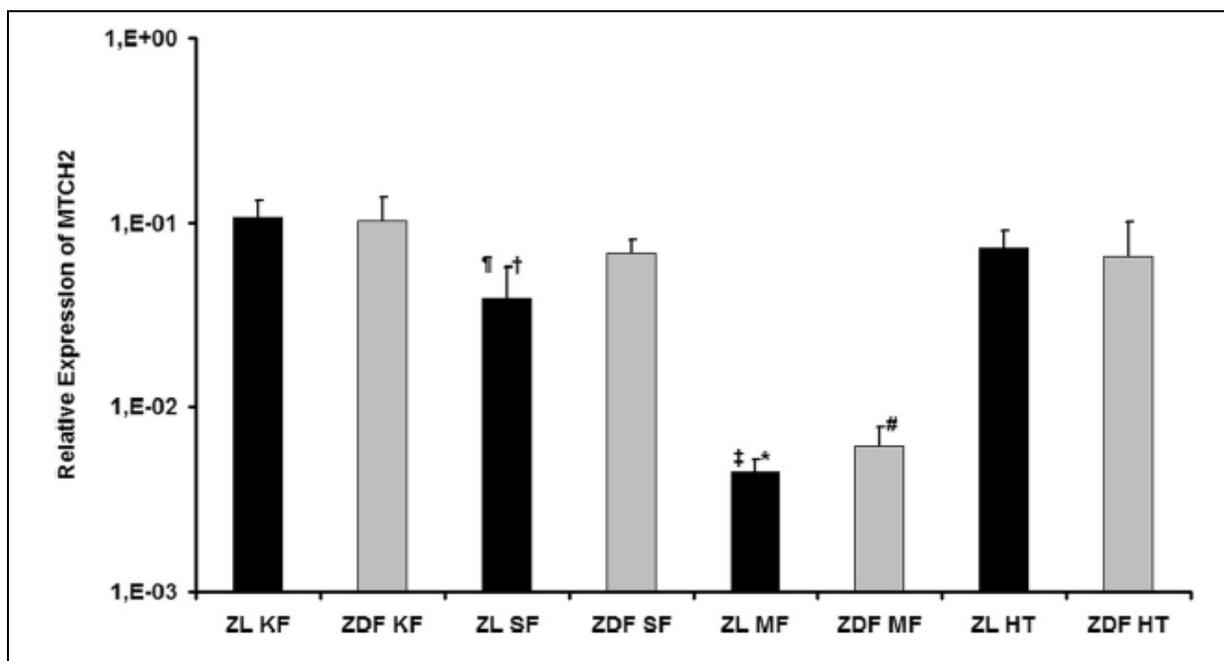


Abbildung 3: Expression von *MTCH2* in ZL- und ZDF-Ratten [Schmid, 2012]

ZL: Zucker lean rats; ZDF: Zucker diabetic fatty rats; KF: Nierenfettgewebe; SF: subkutanen Fettgewebe; MF: mesenteriales Fettgewebe; HT: Hypothalamus

1.3 Bedeutung von *MTCH2* bei der Apoptose

Neben der Adipositas wird *MTCH2* auch eine Bedeutung bei der Apoptose zugemessen. Dabei handelt es sich um einen regulatorischen Mechanismus zur Entwicklung und Erhaltung von Geweben. Eine Störung kann zum einen zu Krebserkrankungen und Autoimmunität (erniedrigte Apoptose), zum anderen zu Degenerationskrankheiten (erhöhte Apoptose) führen. Es gibt zwei große Proteinfamilien, die als Kern des Apoptosemechanismus betrachtet werden, Caspasen und Proteine der *BCL2*-Familie. Die Apoptose ist unterteilt in zwei Signaltransduktionswege, dem extrinsischen und intrinsischen Weg. Der extrinsische Weg wird eingeleitet durch Ligandenbindung an einen Rezeptor der *TNF*-Rezeptorfamilie. Der aktivierte Rezeptor initiiert die Bildung des DISC-Komplexes, der zur Aktivierung der Initiatorcaspase 8 führt und damit eine Caspase-Kaskade auslöst. Der intrinsische Weg hingegen beinhaltet die Aktivierung von proapoptischen Mitgliedern der *BCL2*-Familie, die die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran hervorrufen. Diese resultiert in die Freisetzung von proapoptischen Faktoren wie *Cytochrom c*, die Effektorcaspasen aktivieren. Beide Signalwege sind mit dem Protein *tBID* gekoppelt, welches durch Caspase 8 gespalten wird und die Aktivierung von *BAX* und *BAK* auslöst (Abbildung 4) [Schwarz, 2007]. Frühere Arbeiten zeigen, dass *MTCH2* dabei in die *tBID*-induzierte *BAX*-Aktivierung involviert sein und als Anker-Protein für *tBID* dienen könnte, indem *MTCH2* dessen Verankerung und/oder dessen korrekte Position in der Mitochondrienmembran stabilisiert, um die Aktivierung von *BAX* zu ermöglichen [Schwarz, 2007]. Auch Robinson *et al* konnten zeigen, dass *MTCH2* den *tBID*-induzierten Zelltod (in Leberzellen) fördert, indem es die Rekrutierung von *tBID* zur äußeren Mitochondrienmembran unterstützt, wo dieses dann mit *BAX* interagiert [Robinson, 2012].

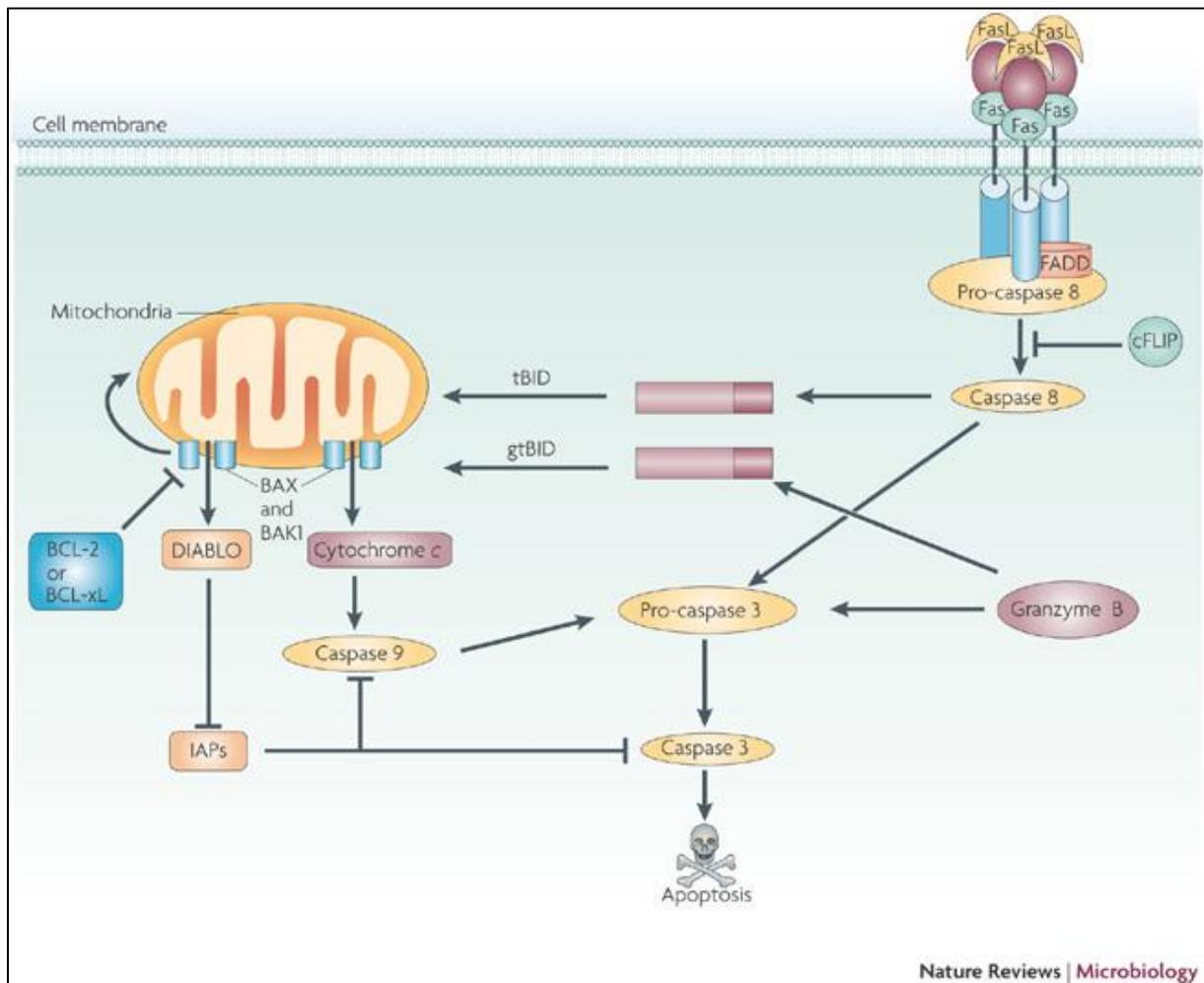


Abbildung 4: Ablauf der Apoptose [Clarke/Tyler, 2009]

[<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n2/images/nrmicro2071-f1.jpg>]

1.4 Der Zebrafisch als Modellorganismus

Neben den Modelltieren wie Maus und Ratte eignet sich auch der Zebrafisch mit einer Vielzahl von Vorteilen auf Grund seiner Eigenschaften als Modellorganismus. Es handelt sich dabei um den Zebrafisch *Danio rerio* (Abbildung 5), der zu den karpfenartigen Fischen gehört. Sein natürlicher Lebensraum befindet sich in den Zuflüssen des Ganges, in Bengalen, Nepal, Pakistan und Bangladesch. Dort lebt er in langsam fließenden und stehenden Gewässern. 1822 wurde der Zebrafisch erstmals beschrieben und ist seit Beginn des 20. Jahrhunderts auch ein beliebter Aquarienzierfisch [Begemann, 2004].



Abbildung 5: Der Zebrafisch

<http://www.vet-magazin.com/tier-fotos/universitaeten/vetmeduni-vienna/Zebrafische/Zebrafische.html>

Die Vorteile, die der Zebrafisch mit sich bringt und die ihn inzwischen zu einem weit verbreiteten Modellorganismus der Genetik und Entwicklungsbiologie machen, finden sich unter anderem in seiner Embryonalentwicklung. Die Embryonen entwickeln sich vollständig außerhalb der Mutter und sind optisch durchsichtig, wodurch die Entwicklung von Zellen, Geweben und Organen bis ins frühe Larvenstadium sichtbar und damit verfolgbar ist. Als diploider Organismus eignet er sich zudem für genetische Analysen. Er hat einen kurzen Generationszyklus, wodurch die Tiere schon mit 12-16 Wochen geschlechtsreif sind. Ein Weibchen kann dabei eine große Anzahl an Eiern pro Woche legen. Der Zebrafisch ist zudem ein preisgünstiges Labortier, da die Haltung der Zebrafische nur wenig Platz in Anspruch nimmt und seine Ansprüche an Wasser und Futter genügsam sind [Begemann, 2004].

1.5 *mtch2* im Zebrafisch

Von großer Bedeutung ist, dass der Zebrafisch eine Vielzahl mit dem Menschen gemeinsamer Eigenschaften besitzt und sich so die beim Zebrafisch gewonnenen entwicklungsbiologischen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen [Begemann, 2004]. *MTCH2* liegt neben dem Menschen auch in einer Vielzahl von anderen Wirbeltieren vor. Die Aminosäuresequenz – besonders im Bereich der funktionellen Domänen - ist stark konserviert (Abbildung 6), so dass das Protein beim Zebrafisch eine 69 %ige Homologie zu humanem *Mtch2* zeigt [Gross, 2005].

```

zf_mtch2 : MADTCGQVLLGSGLTVLSHPLMYIKVLVQVGHEPLAPTLGRNMFGRQVYQLPGLFAYAKH : 60
human_mtch : MADAASQVLLGSGLTILSQPLMYVKVLIQVGYEPLPPTIGRNIFGRQVCQLPGLFSYAQH : 60

zf_mtch2 : IIKIDGKAGLFFKGLAPRLCAGTIGTIVHASKALQKQOE-EKIEVLG--SSLKSDEGSLQQV : 117
human_mtch : IASIDGRRGLFTGLTPRLCSGVLGTVVHCKVLOHYOESDKGEELGPGNVQKEVSSSFDHV : 120

zf_mtch2 : INETTKEMIARSCATVVTHPFHVITLROMVQFIGREAKYSGVFDISIVTIYREEGILGFFA : 177
human_mtch : IKETTREMIARSAATLITHPFHVITLRSMVQFIGRESKYCGLCDSIITIYREEGILGFFA : 180

zf_mtch2 : GLIPRLLGDVLSLWICNMLAHEINTYTIIDESTSHTGEIKNCSQAVTGFFASMLTYPFVLV : 237
human_mtch : GLVPRLLGDILSLWLCNSLAYLVNTYALDSGVSTMNEMKSYSQAVTGFFASMLTYPFVLV : 240

zf_mtch2 : SNMMAVNNCGLAGGLPPYAAYPNWLHCWSHLSREGNMSRGNSLFFRKLPAKTYAIEQK : 297
human_mtch : SNLMAVNNCGLAGGCPPYSPIYTSWIDCWMLQKEGNMSRGNSLFFRQVPEGKTYCCDLK : 300

zf_mtch2 : RFF : 300
human_mtch : MLI : 303
    
```

Abbildung 6: Konservierung von Mtch2 im Zebrafisch

Betrachtet man die Expression von *mtch2* im Zebrafisch (Abbildung 7) über quantitative *Real Time* RT-PCR erkennt man die schwache Expression während der frühen Embryonalentwicklung mit einer Hochregulierung der Expression an den Tagen fünf bis neun (A). Die Expression erfolgt in adulten Zebrafischen vor allem in Herz, Leber, Muskel und Darm, aber auch im viszeralem Fettgewebe (B).

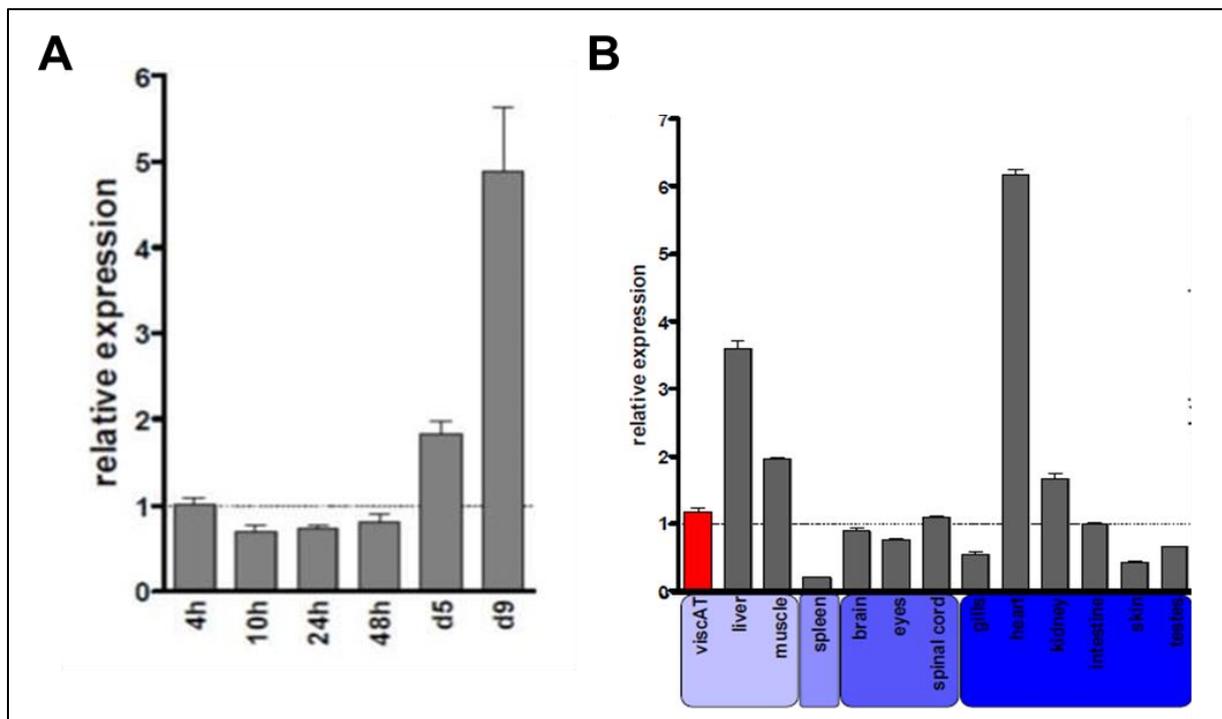


Abbildung 7: Expression von *mtch2* im Zebrafisch

A: Expression während der Embryonalentwicklung, B: Expression in verschiedenen Geweben des adulten Zebrafisches

Die Expression in den verschiedenen Geweben des Zebrafisches kann ebenfalls durch *In situ* Hybridisierung nachgewiesen werden (Abbildung 8). An Tag 2 nach der Befruchtung kann man die Expression von *mtch2* vor allem in Auge, Gehirn und Leberprimordium erkennen, an Tag 4 in Auge, Gehirn, Leber und Darm [Landgraf, 2013, unveröffentlicht].

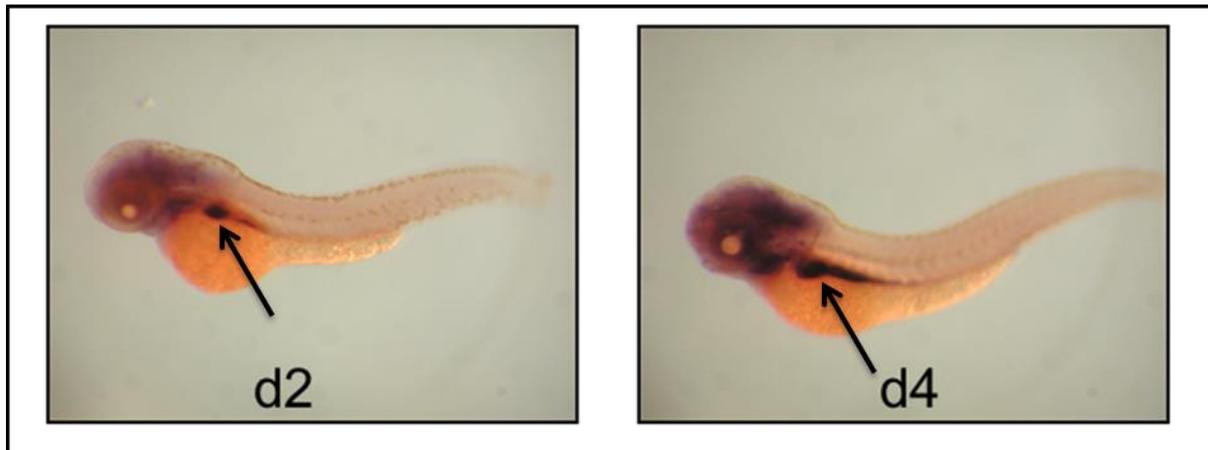


Abbildung 8: Nachweis der *mtch2*-Expression durch *In situ* Hybridisierung

Die Pfeile deuten auf die durch *In situ* Hybridisierung gefärbten Bereiche von Kopf, Augen, Leber und Darm der Zebrafische.

1.6 Gen-Knockdown durch Morpholinoinjektion

Um einen ersten Eindruck über die Funktion eines noch nicht genauer charakterisierten Gens zu bekommen, ist es hilfreich dieses mit geringem experimentellem Aufwand zu inaktivieren und den resultierenden mutanten Phänotyp näher zu untersuchen. Eine Methode die dafür angewendet wird, sind die so genannten „*antisense*“-Technologien. Diese basieren darauf, dass eine mRNA gezielt inaktiviert wird, indem ein komplementärer Nukleinsäurestrang in der lebenden Zelle an die gewünschte mRNA bindet und sie dadurch biologisch inaktiviert [Eisen/Smith, 2008]. Diese Technik wurde schon vor 30 Jahren entwickelt [Inzant/Weintraub, 1984]. Seit dem Jahr 2000 wird eine abgewandelte *antisense*-Methode erfolgreich angewandt, um im Zebrafisch und anderen Modellorganismen gezielt Transkripte zu inaktivieren. Sie beruht nicht auf Oligoribonukleotiden (*antisense*-RNAs), sondern auf Morpholino genannten, chemisch synthetisierten RNA-Analoga. Morpholinos werden mit einer dünnen Glaskapillare in befruchtete Oozyten injiziert, wo sie hybride Doppelstränge mit komplementären mRNA-

Einzelsträngen bilden. Die Nukleotidsequenz der Morpholinos besteht aus 25 Basen, beziehungsweise 25 Morpholinuntereinheiten [Begemann, 2004]. In Morpholinos sind die heterozyklischen Basen im Gegensatz zur DNA mit einem heterozyklischen Morpholinring anstatt einer Ribose verbunden, zudem sind die Phosphoramidatgruppen ungeladen (Abbildung 9).

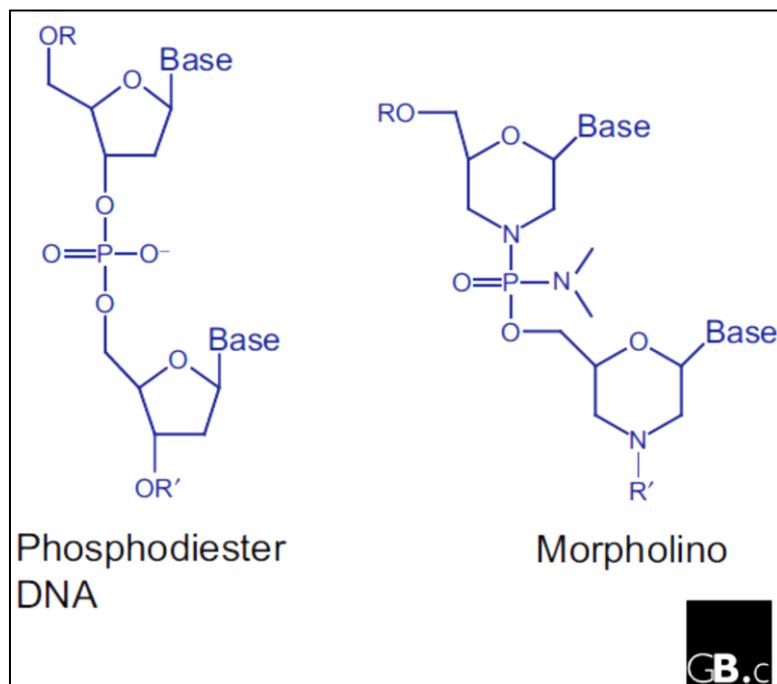


Abbildung 9: Struktur von DNA und Morpholino [Corey/Abrams, 2001]

Die Wirkungsweise von Morpholinos ist vergleichbar mit der von siRNAs, ihr Vorteil besteht jedoch in der höheren Stabilität und damit längeren Halbwertszeit, da sie keine RNase-Substrate darstellen und damit weniger schnell abgebaut werden [<http://www.gene-tools.com/>]. Sie wirken dabei auf verschiedene Weisen, je nachdem, welche Nucleotidsequenz ausgewählt wurde. Dabei können sie erstens den Beginn der Translation im Cytosol hemmen, wenn die Binderegion des Morpholinos in den ersten 25 Nukleotiden der codierenden mRNA-Sequenz eines Gens liegt und damit auf die 5'-UTR abzielt. Des Weiteren kann das prä-mRNA-*Splicing* im Zellkern verändert werden, wenn der Morpholino auf eine *Splice*-Stelle zwischen Intron und Exon im Gen abzielt und zuletzt können Morpholinos die miRNA-Bildung und -Aktivität hemmen [<http://www.gene-tools.com/>; Eisen/Smith, 2008].

2 Zielstellung

Die Erkenntnisse über die Expression von *mtch2* im Zebrafisch führen zu der Hypothese, dass *mtch2* eine Funktion in Leber und Darm hat, die im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert werden sollen. Des Weiteren ergibt sich aus den Erkenntnissen, dass *mtch2* mit dem Auftreten von Adipositas assoziiert und zudem in die Adipozytendifferenzierung *in vitro* involviert ist die Fragestellung, ob *mtch2* zudem eine Rolle bei der Fettgewebsentwicklung spielt.

Die Arbeit gliedert sich dabei in zwei große Schwerpunkte.

Zum Ersten die Etablierung des *Knockdowns* von *mtch2* im Zebrafischmodell, der mit Hilfe von zwei Morpholinos induziert werden soll. Bei den Morpholinos *zfmtch2* MO1 und MO2 handelt es sich dabei um Morpholinos, die auf die *Splice-Site* Intron1-Exon2 beziehungsweise Exon1-Intron1 im *mtch2*-Gen abzielen und somit das *Splicing* der prä-mRNA und die Bildung des Proteins verhindern. Die Auswertung des *Knockdowns* erfolgt über Agarosegelelektrophorese und Quantifizierung mit RT-PCR.

Zum Zweiten soll der Phänotyp der Fische, die den *Knockdown* von *mtch2* enthalten, beurteilt werden. Das beinhaltet die mikroskopische Beurteilung des Phänotyps sowie weiterführende Untersuchung von Leber und Darm der Fische. Diese erfolgen mit spezifischen Leber- und Darmmarkern durch *In situ* Hybridisierung und quantitative RT-PCR. Die Adipozytenentwicklung wird mit der Methode der Nilrot-Färbung analysiert und das Essverhalten der Fische näher untersucht.

3 Material und Methoden

Tabelle 1: Verwendete Materialien

Chemikalien	
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Agarose, Wide Range	Serva Electrophoresis GmbH
BCIP	Roche Diagnostics GmbH
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
BSA	Invitrogen GmbH
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethanol	Merck KGaA
HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
Heparin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	J.T. Baker
Methylcellulose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
MgCl ₂	Carl Roth GmbH & Co. KG
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
Na ₂ H ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG
NaH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG
NaOH	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumacetat	Merck KGaA
NBT	Roche Diagnostics GmbH
Nilrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
PBS	Invitrogen GmbH
PFA	Carl Roth GmbH & Co. KG
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Phenolrot 0,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<i>RotiSafe</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG
<i>Sheep serum</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Silikonöl	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tricain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Chemikalien	
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Zitronensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Geräte	
7500 Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems®
Binokular SMZ 168	Motic
Injektionsanlage	World Precision Instruments, Inc.
Mikropipetten-Puller P-2000	Sutter Instrument Co.
Mikroskop Axio Zoom.V16	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Spectrophotometer ND-1000	peqLab Biotechnologie GmbH
Zebrafischanlage PP-Modul	Aqua Schwarz GmbH, Göttingen
Kommerzielle Kits	
<i>DIG Labeling Mix</i>	Roche Diagnostics GmbH
dNTP-Set 1 (pH 7)	Carl Roth GmbH & Co. KG
<i>Fluoresbrite™ Plain YG 2.0 Micron Microspheres</i>	Polysciences, Inc.
<i>GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder</i>	Fermentas GmbH
<i>GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder</i>	Fermentas GmbH
<i>Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2X)</i>	Thermo Scientific
<i>M-MLV Reverse Transkriptase</i>	Invitrogen GmbH
<i>QIAshredder Mini Spin Column</i>	Qiagen GmbH
<i>qPCR MasterMix Plus Low ROX</i>	Eurogentec
<i>Random Primers</i>	Invitrogen GmbH
<i>RNase-Free DNase Set</i>	Qiagen GmbH
<i>RNeasy® Mini Kit</i>	Qiagen GmbH
Verbrauchsmaterial	
Glaskapillaren GB 100F-10	Science Products GmbH
Software	
7500 Real-Time PCR-Software	Applied Biosystems®
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc.
ImageJ	Wayne Rasband
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation

Software	
NCBI-Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Zen pro 2012	Carl Zeiss Microscopy GmbH

Alle verwendeten Morpholinos wurden bei Gene Tools, LLC bestellt.

Tabelle 2: Verwendete Morpholinos

Morpholino	Sequenz 5'-3'	Konzentration
MO1 (<i>zfmtch2-i1-e2</i>)	GCG GAT TGT GTA AAT CCT ACC TGA A	2 mM
MO2 (<i>zfmtch2-e1-i1</i>)	TGT CCG ACC TAT TTA CAA AGA TAC A	2 mM
Standard Ctrl	CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A	2 mM

Alle verwendeten Primer wurden bei Biomers.net bestellt.

Tabelle 3: Verwendete Primer und Sonden

Primer	Sequenz 5'-3'	Konzentration
<i>β-actin-fw</i>	TCC CCT TGT TCA CAA TAA CCT ACT AA	100 pmol/μL
<i>β-actin-rv</i>	CAT ACC GGA GCC GTT GTC A	100 pmol/μL
<i>β-actin</i> <i>TaqMan-Sonde</i>	AGC GAT TTC CTC ATC CAT GGC TGT GT	100 pmol/μL
<i>tbp-fw</i>	CCT GCG AAT TAT CGT TTA CGT CTT	100 pmol/μL
<i>tbp-rv</i>	ACG GCA TCA TAG GAC TGA AAA TG	100 pmol/μL
<i>tbp</i> <i>TaqMan-Sonde</i>	TTG CTT CAT AAC CTG TCA GCA TGG AGC A	100 pmol/μL
<i>zfmtch2-fw1</i>	CCA CCC GCT TAT GTA CAT CAA G	100 pmol/μL
<i>zfmtch2-rv1</i>	TGA TAA TGT GTT TGG CAT ATG CAA	100 pmol/μL
<i>zfmtch2-exon3-rv</i>	CCA ATG GTC CCA GCA CAA AG	100 pmol/μL
<i>zfmtch2-intron1-rv</i>	ACC AGT GTA GCA GGA GTG AT	100 pmol/μL
<i>zfmtch2</i> <i>TaqMan-Sonde</i>	ATG AAC CTC TCG CTC CCA CCC TAG GA	100 pmol/μL

Tabelle 4: Verwendete Enzyme (E) und Antikörper (A)

Enzym/Antikörper	Firma
<i>HindIII</i> (E)	New England Biolabs GmbH
<i>XhoI</i> (E)	Fermentas GmbH
<i>DNAseI</i> (E)	Qiagen GmbH
<i>RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor</i> (E)	Invitrogen GmbH
<i>rRNasin RNase Inhibitor</i>	Promega
<i>Proteinase K</i> , rekombinant, PCR Grade (E)	Roche Diagnostics GmbH
<i>DIG</i> (A)	Roche Diagnostics GmbH
<i>Anti-DIG</i> (A)	Roche Diagnostics GmbH

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Herkunft	Referenz
pCRII- <i>fabp2</i>	TA-cloning vector, Amp ^r , Kan ^r <i>Fatty acid-binding protein 2</i> Darmmarker	David A. Jones	Rai <i>et al</i> 2010
pCRII- <i>fabp10</i>	TA-cloning vector, Amp ^r , Kan ^r <i>Fatty acid binding protein 10a</i> Lebermarker	David A. Jones	Rai <i>et al</i> 2010

3.1 Zebrafischanlage PP-Modul AQUA Schwarz GmbH

Für die Haltung der Zebrafische dient eine Aquarienanlage aus einem PP (Produktionsplanung)-Modul als Spezialanfertigung mit sieben Etagen für die Verwendung von Hälterungsboxen für Zebrabärblinge (*Danio rerio*). Das Aquarienmodul kann pro Etage mit maximal acht 3 L-Becken (für 15 adulte oder 60 juvenile Fische) beziehungsweise sieben 5 L-Becken (für 25 adulte oder 100 juvenile Fische) bestückt werden. Es handelt sich dabei um ein Rezirkulationssystem mit einem Gesamtwasservolumen von 240 L, in welchem das Aquarienwasser über einen biologischen Filter gereinigt und anschließend wiederverwendet wird. Als Aquarienwasser dient Trinkwasser, das über eine Reverse Osmoseanlage aufgereinigt und anschließend in einem Vorratstank (100 L) entsprechend der Anforderungen wieder aufgesalzt (Natriumcarbonat, Meersalz, Kalziumsulfat) wird. Dadurch wird die Haltung der Fische unter standardisierten Bedingungen gewährleistet. Die Qualität des Aquarienwassers wird anhand des pH-Wertes (pH 6-8) und der Leitfähigkeit (300-600 µS) durch direkt am PP-Modul angebrachte Messgeräte ständig überprüft und täglich dokumentiert. Zudem wird die konstante Temperatur (26-28 °C) durch ein digitales Temperatur- Mess- und Regelgerät kontrolliert und gesteuert. Das Licht des Raumes wird über eine elektronische Zeitschaltuhr in einem Hell-Dunkel-Zyklus von 14 h : 10 h gesteuert.

Injizierte Zebrafischembryonen (3.2.2) wurden bis d4 in Petrischalen mit täglichem Medienwechsel bei 30 °C gehalten und ab d4 mit an das System angeschlossen. Die Fütterung der ausgewachsenen Fische erfolgte mit Flockenfutter (TetraMin, Tetra GmbH) und Artemien (Silver Star), bei der Aufzucht von Fischlarven erfolgte die Fütterung von Eigelbpulver (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und Staubfutter (Sera micron, Sera GmbH).

3.2 Etablierung des *Knockdowns* von *mtch2*

3.2.1 Verpaarung der Zebrafische

Die Verpaarung der Zebrafische erfolgte am jeweiligen Morgen der Morpholino-Injektion. Dafür wurden am Abend des vorherigen Tages Zebrafisch-Paare (bestehend aus männlichem und weiblichem Tier) in Plastikwannen, getrennt durch Siebe, zusammengesetzt. Am nächsten Morgen wurde nach Einschalten des Lichtes

das Wasser in den Plastikwannen durch temperiertes Frischwasser ersetzt und die Fisch-Paare oberhalb der Trennsiebe vereint. Die Eier, die von den Weibchen gelegt und von den Männchen befruchtet wurden, fielen somit durch das Sieb auf den Boden der Plastikwannen und waren vor den ausgewachsenen Fischen, die starke Laichräuber sind, geschützt. Nach etwa 30 min konnten die Embryonen im Ein- bis Zwei-Zellstadium (siehe Anhang) für die Injektionen aus den Plastikwannen entnommen werden.

3.2.2 Mikroinjektion der Morpholinos

Die Methode der Morpholino-Injektion gehört zu den so genannten "antisense-Technologien", bei denen eine mRNA gezielt inaktiviert wird, indem ein chemisch synthetisiertes RNA-Analoga mit einer Größe von 25 bp in der lebenden Zelle an die gewünschte mRNA bindet. Dadurch werden die Translation oder das Splicing der prä-mRNA und damit die Bildung des Proteins gehemmt.

Die Injektion der Morpholinos erfolgte in Zebrafisch-Embryonen (Ein- bis Zwei-Zellstadium) mit einem Druckluft-Mikroinjektor. Die Morpholinos (Tabelle 2) wurden vor den Injektionen im Verhältnis 1:4 mit Phenolrot verdünnt, für 10 min auf 65 °C erhitzt und gevortext. Die Nadeln für die Injektionen wurden mit dem Mikropipetten-*Puller* aus Glaskapillaren gezogen und konnten mit Hilfe einer dünnen elastischen Pipettenspitze mit 1,9 µl Morpholinolösung befüllt werden. Das zu injizierende Volumen wurde über die Größe der Tropfen in Silikonöl eingestellt und des Weiteren über Injektions- und Haltedruck sowie Injektionszeit reguliert. Die Fixierung der Embryonen erfolgte mit Hilfe speziell gegossener Agaroseplatten, die Vertiefungen enthielten, in die die Embryonen mit leichtem Druck gepresst wurden. Unter dem Binokular wurde das entsprechend eingestellte Volumen an Morpholino-Lösung in die befruchteten Oozyten injiziert. Dabei handelte es sich um die Injektionsmengen 4 ng und 8 ng Morpholino. Bei jeder Injektion wurde zusätzlich die gleiche Anzahl an Embryonen mit dem höchsten im Versuch verwendeten Volumen Kontroll-MO injiziert. Nach der Injektion wurden die Embryonen in Petrischalen in frischem 1X Danieau-Medium bei 30 °C bis d4 (bei täglichem Medienwechsel) inkubiert. Ab d4 wurden die Zebrafisch-Larven mit an die Zebrafischanlage gebracht.

10X Danieau-Puffer [174 mM NaCl; 2,1 mM KCl; 1,2 mM MgSO₄; 1,8 mM Ca(NO₃)₂; 15 mM HEPES; pH 7,6]

3.2.3 Isolation der Gesamt-RNA aus Zebrafisch-Embryonen

Um die Qualität und Stabilität des *Knockdowns* von *mtch2* auf Expressionsebene zu untersuchen, wurden 15 Embryonen an d1 und jeweils 8 Embryonen an d4 und d8 nach der Injektion für die RNA-Isolation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mittels *RNeasy[®] Mini Kit* von Qiagen nach Anleitung. Laut den Angaben des Herstellers beruht diese Methode auf der Aufreinigung der RNA über eine Silikamembran. Dabei sind das schnelle Einfrieren der Proben und RNase-freie Arbeitsbedingungen von entscheidender Bedeutung, um eine Degradierung der RNA zu verhindern. Mit dieser Methode wird mRNA angereichert, da RNA-Moleküle mit weniger als 200 Nukleotiden ausselektiert werden [Qiagen 2012].

Hierbei wurden alle angegebenen optionalen Schritte durchgeführt. Dazu gehörte unter anderem ein DNase-Verdau mit RNase-freier *DNaseI* (1500 Kunitz units), um kontaminierende DNA zu entfernen. Das Zelllysat jeder Probe wurde zudem mittels *QIAshredder Mini Spin Column* von Qiagen für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit der Zentrifuge zusätzlich homogenisiert. Die Elution der RNA erfolgte mit 30 µl RNase-freiem Wasser.

Die Bestimmung der RNA-Konzentrationen erfolgte photometrisch mittels Spectrophotometer ND-1000. Das eingesetzte Probenvolumen betrug 1,5 µl. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

3.2.4 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Für die Umschreibung der mRNA in cDNA wurde die M-MLV RT genutzt. Diese RNA-spezifische DNA-Polymerase synthetisiert unter Verwendung von Hexamerprimern (*random primer*) und dNTPs aus einer einzelsträngigen RNA einen komplementären DNA-Strang. Es wurden 500 ng RNA umgeschrieben, die mit 1 µl *random primer* (250 ng) und 1 µl dNTP Mix (10 mM) versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt wurden. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden dem Ansatz 4 µl *First-Strand* Puffer (5x), 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl RNaseOUT (40 units/µl) zugegeben und für 2 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 1 µl M-MLV RT (200 units) zu den Proben gegeben. Es folgten Inkubationen bei 25 °C für 10 min

und 37 °C für 50 min und anschließend die Hitze-Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C für 15 min. Als Kontrolle wurde zusätzlich eine RT-negativ Kontrolle ohne M-MLV RT mitgeführt.

5X First-Strand Puffer [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂]

3.2.5 Überprüfung des *Knockdowns*

Die Überprüfung des *Knockdowns* erfolgte über Agarosegelelektrophorese und quantitative Real Time RT-PCR (qRT-PCR). Alle verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 3 aufgeführt. In Abbildung 10 sind zudem die Lage der *zfmtch2*-Primer im Wildtyp (A) und in den injizierten Fischen (B) dargestellt.

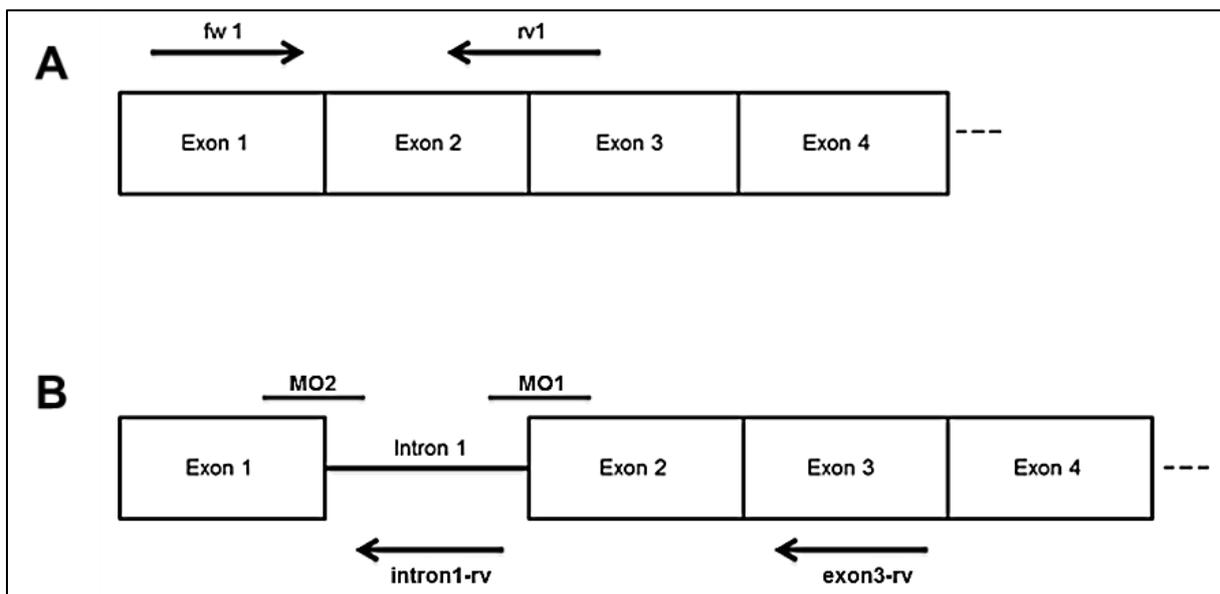


Abbildung 10: Lage der *zfmtch2*-Primer und Morpholinos im Gen

A: im Wildtyp, B: in MO-injizierten Fischen

Für die Auswertung über Agarosegelelektrophorese musste im Vorfeld eine PCR mit folgendem Probenansatz (A) und Temperaturprofil (B) (Abbildung 11) durchgeführt werden.

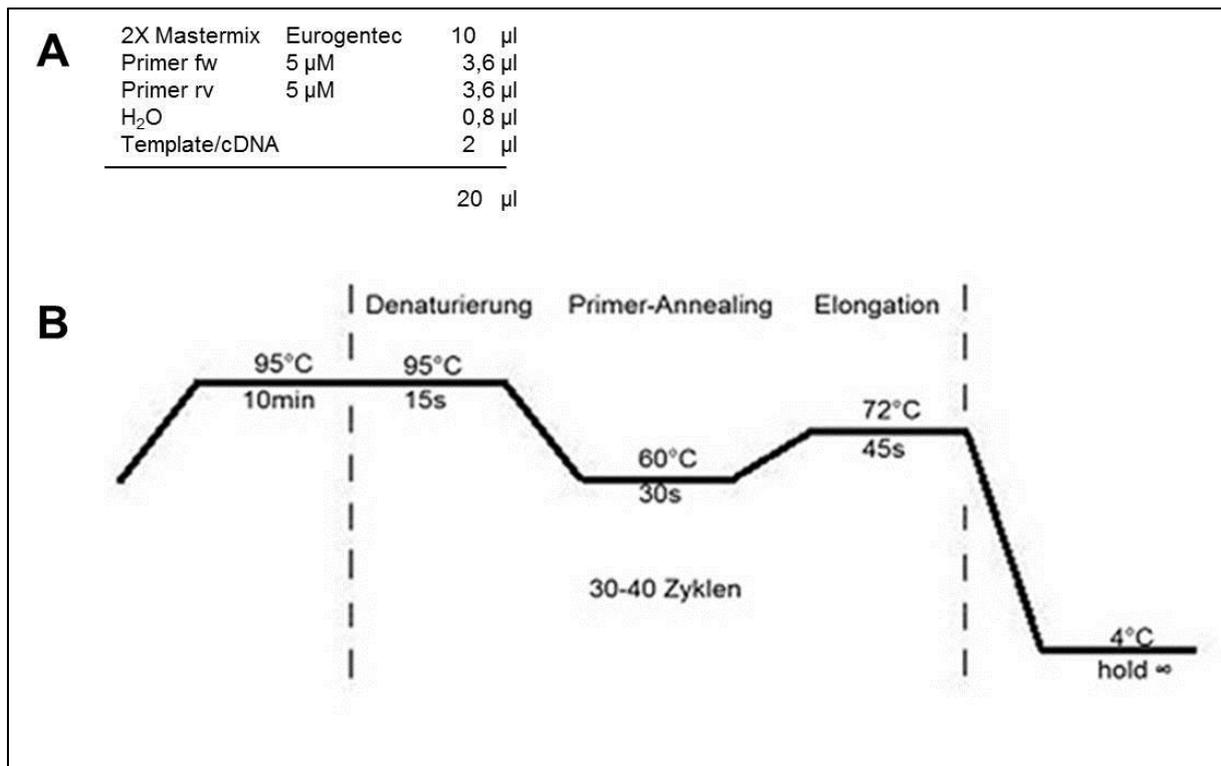


Abbildung 11: DNA-Vervielfältigung mittels PCR

A: Probenansatz, B: Temperaturprofil

Die PCR ist eine Methode, um einen bestimmten DNA-Abschnitt *in vitro* zu amplifizieren. Dabei wird die Ausgangs-DNA zuerst bei 95 °C denaturiert, um die beiden Doppelstränge zu trennen. Im anschließenden *Annealing*-Schritt wird die Temperatur gesenkt, sodass die spezifischen Oligonukleotidprimer an die Enden des gewünschten DNA-Abschnittes hybridisieren können. Es folgt die Elongation bei 72 °C. Hierbei handelt es sich um das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, die beginnend am 3'-Ende aus dNTPs den komplementären DNA-Strang synthetisiert. Dieser Zyklus wird bis zu 40-mal wiederholt, bis die gewünschte Menge an DNA vorhanden ist [Mühlhardt 2003].

Jede PCR wurde mit drei genspezifischen Primerpaaren durchgeführt. Als fw-Primer wurde dabei immer *zfmtch2-fw1* eingesetzt, als rv-Primer *zfmtch2-rv1*, *zfmtch2-exon3-rv* oder *zfmtch2-intron1-rv*. Für die Gelelektrophorese wurden die Proben 1:5 mit 6X Xylencyanol als DNA-Ladepuffer versetzt und auf 1,5%igen Agarosegelen, gefärbt mit *RotiSafe*, in 1X TAE-Puffer aufgetrennt. Zur Bestimmung der Größe der Fragmente wurde die DNA-Leiter *GeneRuler™ 100bp Plus* mitgeführt.

1X TAE-Puffer [40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA]

6X Xylencyanol [500 µL 1% Xylencyanol, 600 µL Glycerol, 40 µL TAE, 860 µL a.d.]

Die qRT-PCR ist eine Weiterentwicklung der PCR, die die gleichzeitige Amplifikation und Quantifizierung einer DNA-Sequenz ermöglicht. Für die Genexpressionsanalysen wurde das *TaqMan*-Prinzip verwendet (Abbildung 12). Die sequenzspezifischen Sondenmoleküle sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Reporter (FAM) und einem Quencher-Molekül (TAMRA) markiert. Bei den *TaqMan*-Sonden erhält man zunächst kein Fluoreszenzsignal, da der Quencher die Fluoreszenzemission des Reporters unterdrückt. Erreicht die Taq-DNA-Polymerase während der Synthese des Zweitstranges die Sonde, wird diese durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität hydrolytisch gespalten, sodass Reporter und Quencher voneinander getrennt werden. Die Anregung des Reporters führt dann zur Emission einer Fluoreszenz definierter Wellenlänge, die messtechnisch erfasst werden kann. Diese Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge und damit proportional zur Menge an Ausgangs-DNA [Bangsow et al 2002].

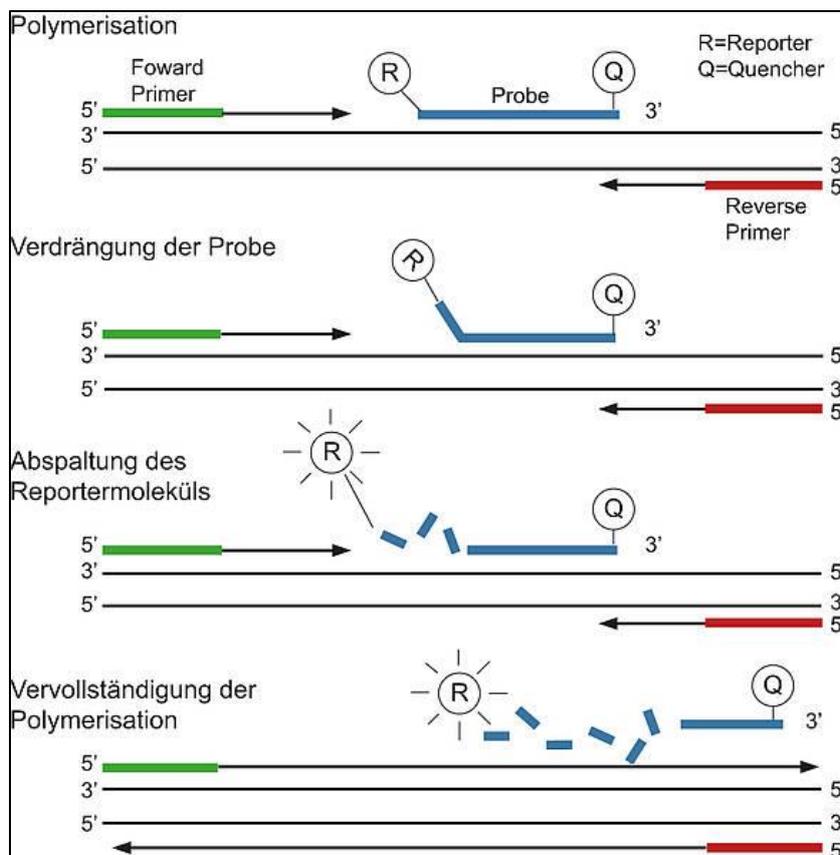


Abbildung 12: Prinzip der *TaqMan*-Sonden

[<http://www.medicinische-genetik.de/index.php?id=8706>]

Die qRT-PCR wurde in 96-well-Platten mit folgendem Probenansatz (A) und Temperaturprofil (B) durchgeführt (Abbildung 13).

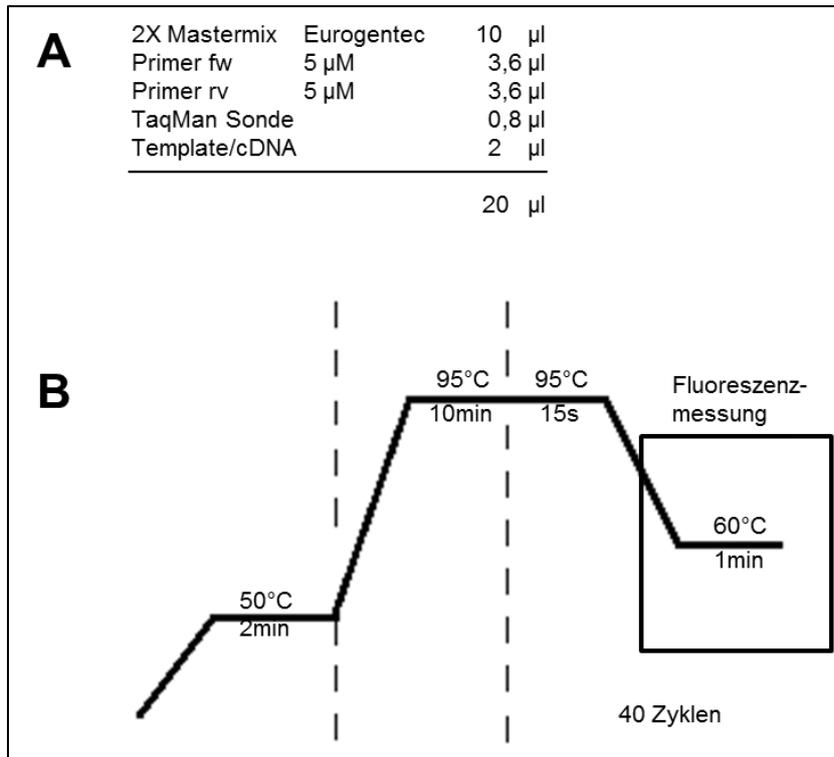


Abbildung 13: DNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR

A: Probenansatz, B: Temperaturprofil

Neben dem genspezifischen Primerpaar (*zfmtch2-fw1* und *rv1*) wurden zusätzlich die Referenzgene *β -actin* und *tbp* gemessen. Zudem wurde bei jeder Messung eines Gens eine Standardkurve in Form eines Standardplasmides oder Zebrafisch-uni-cDNA erstellt, um die Menge an gebildeter DNA quantifizieren zu können. Die Analyse und Auswertung der Daten erfolgte über die 7500 Real-Time PCR-Software sowie Microsoft Excel.

3.3 Analyse des Phänotyps

3.3.1 Fotodokumentation

Der Phänotyp der Zebrafischembryonen beziehungsweise –larven wurde jeweils an Tag 1, 4 und 8 nach der Injektion dokumentiert. Dazu wurden die Fische im Vorfeld mit Tricain (300 mg/L) betäubt und in 2 %iger Methylcellulose fixiert. An d1 musste zudem die Eihülle um die Embryonen mit Hilfe von Pinzetten entfernt werden. Die

Fotos wurden mit dem Mikroskop Axio Zoom.V16 von Zeiss unter Einstellung von verschiedenen Vergrößerungen gemacht und mit der Software Zen pro 2012 digitalisiert.

Tricain [400 mg Tricain; 97,9 mL dd-Wasser; 2,1 mL 1 M Tris (pH 9); pH 7]

3.3.2 *In situ* Hybridisierung

Die *In situ* Hybridisierung ist eine molekularbiologische Methode zum Nachweis von Nukleinsäuren in Geweben. Dabei wird eine künstlich hergestellte Sonde aus einer Nukleinsäure eingesetzt, die über Basenpaarungen an die nachzuweisende Nukleinsäure bindet (Hybridisierung). Der Nachweis erfolgt also direkt in der jeweiligen Struktur (*in situ*). Bei dieser Anwendung findet vor allem Digoxigenin-markierte RNA Verwendung, die mit Hilfe eines Antikörpers erkannt werden kann. Beim Nachweis von mRNA in Geweben werden nur jene Zellen angefärbt (hybridisiert), in denen ein zu untersuchendes Gen aktiv ist, denn nur hier liegt die entsprechende mRNA vor. Das Gewebe muss für die Färbung zunächst fixiert werden.

3.3.2.1 Herstellung der RNA-Sonden

Die RNA-Sonden wurden jeweils als *sense*- und *antisense*-Sonden hergestellt. Für die Auswahl der geeigneten Restriktionsenzyme und Polymerasen war es wichtig, die vorliegenden Plasmide zu sequenzieren und die Orientierung der Gene im Vektor mit Hilfe von *NCBI-blastx* zu erörtern (Abbildung 14, Tabelle 6).

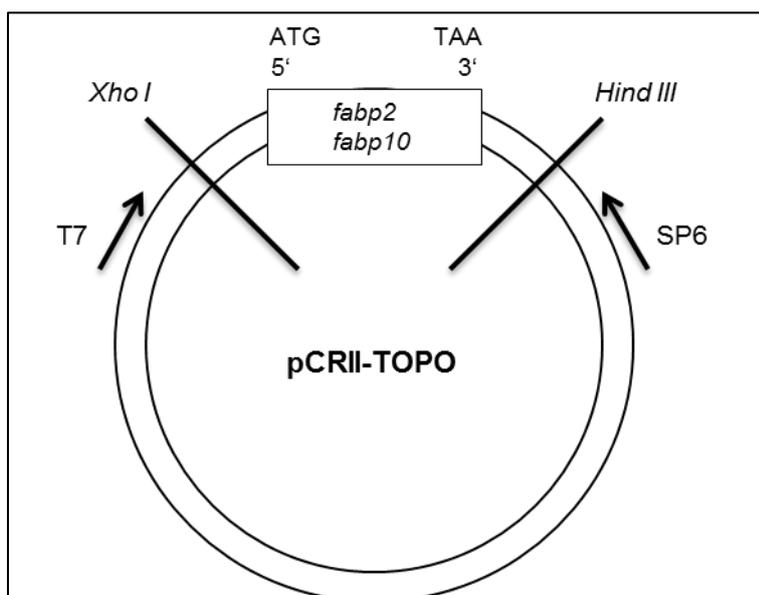


Abbildung 14: Orientierung der Gene *fabp2* und *fabp10* im Vektor

Für die Herstellung der DIG-markierten RNA-Sonden wurden 5 µg Plasmid, die die cDNA des entsprechenden Gens enthielten, durch den Verdau mit 2,5 µL Restriktionsenzym (*Hind III* (20 units/µL), *Xho I* (10 units/µL)) linearisiert. Anschließend wurden die Plasmide durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung aufgereinigt. Für die Extraktion wurde die Probe mit HPLC-Wasser auf 200 µL aufgefüllt und 1 vol Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben. Danach wurde die Probe 1 min gevortext, für 2 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-*Tube* pipettiert. Zu diesem wurde 1 vol Chloroform gegeben und wie oben beschrieben verfahren. Für die Ethanol-Fällung wurden zu dem Überstand 1/10 vol 3M Natriumacetat und 1 vol Isopropanol zur Probe gegeben und für 10 min bei -20 °C inkubiert. Danach wurde für 10 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, das Pellet getrocknet und in 30 µL HPLC-Wasser resuspendiert. Für die Transkription mit T7- oder Sp6- RNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH) wurden 1 µg der aufgereinigten Plasmid-DNA, unter Nutzung des DIG Labeling Mix und rRNasin, eingesetzt.

Tabelle 6: Polymerasen und Restriktionsenzyme für die Herstellung der RNA-Sonden

Plasmid		Restriktionsenzym	Polymerase
pCRII- <i>fabp2</i>	<i>sense</i>	<i>Hind III</i>	T7
	<i>antisense</i>	<i>Xho I</i>	SP6
pCRII- <i>fabp10</i>	<i>sense</i>	<i>Hind III</i>	T7
	<i>antisense</i>	<i>Xho I</i>	SP6

3.3.2.2 Überprüfung der Markierungseffizienz

Zur Überprüfung der Markierungseffizienz der RNA-Sonden wurde ein *DotBlot* durchgeführt. Dazu wurden die DIG-markierten RNAs in den Verdünnungen 50 ng/µl und 5 ng/µl sowie die Kontroll-RNA *myoD* auf eine Nylonmembran aufgetragen und durch „*crosslinking*“ mit UV-Licht fixiert. Die Membran wurde zunächst in PBS-Tween 5 min gewaschen und anschließend 15 min in Blockpuffer geblockt. Der Nachweis der eingebauten DIG-Moleküle erfolgte durch einen, mit alkalischer Phosphatase gekoppelten, Anti-DIG-Antikörper. Dieser wurde 1:5000 in Blockpuffer verdünnt und die Membran für 30-45 min inkubiert. Danach wurde die Membran 2-mal für 10 min in PBS-Tween gewaschen und 5 min in Alkalischem Tris-Puffer äquilibriert. Die Substratreaktion erfolgte im Dunkeln durch Inkubation der Membran in einer

NBT/BCIP-Substratlösung (1:100 in Alkalischem Tris-Puffer) für 15-30 min. Die Farbreaktion wurde schließlich mit PBS gestoppt.

20X PBS [21,8 g Na₂HPO₄; 6,4 g NaH₂PO₄; 180 g NaCl; mit a.d. auf 1000 mL; pH 7,4]

PBS-Tween [1X PBS; 0,1 % Tween 20]

Blockpuffer [15 mL PBS-Tween; 300 µL Sheep serum; 400 µL 7,5 % BSA]

Alkalischer Tris-Puffer [Tris HCL 100mM; MgCl₂ 50 mM; NaCl 100mM; 0,1 % Tween 20; a.d.]

3.3.2.3 Durchführung *In situ* Hybridisierung (nach Thisse 2008)

Die *In situ* Hybridisierung wurde mit fixierten Fischlarven der Entwicklungsstufe d4 nach der Injektion durchgeführt. Als Vorbereitung mussten diese für 24 h bei -20 °C in 100 %igem Methanol entwässert werden. Die *In situ* Hybridisierung wurde an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt.

Tag 1: Permeabilisierung und Hybridisierung der Larven

Für die Permeabilisierung und Hybridisierung mussten die Larven zuerst rehydriert werden. Die dehydrierten Larven wurden dazu in kleine Siebe überführt und die benötigten Lösungen in 12-Well Platten bei Raumtemperatur vorbereitet:

- 75 % (vol/vol) Methanol – 25 % PBS-Tween
- 50 % (vol/vol) Methanol – 50 % PBS-Tween
- 25 % (vol/vol) Methanol – 75 % PBS-Tween.

Nach jeweils 5 min wurden die Siebe in das nächste *Well* mit der nachfolgenden Verdünnung überführt. Anschließend wurden die Larven 3-mal für 5 min in 100 % PBS-Tween gewaschen.

Die Permeabilisierung erfolgte durch einen Proteinase K-Verdau (10 µg/mL) für 7 min. Dieser wurde durch die Inkubation der Larven in 4 %igem PFA für 20 min abgestoppt. Danach wurden die Larven erneut in PBS-Tween, 4-mal für 5 min, gewaschen.

Zuletzt wurden die Larven in sterile 1,5 mL Eppendorf-*Tubes* überführt und mit 700 µL Hybridisierungs-Mix (HM), der Heparin (Sigma) und tRNA (Sigma) enthielt, für 2-5 h im Wasserbad bei 70 °C prähybridisiert. Nach der Inkubation wurde der HM abgenommen und mit 500 µL HM mit Heparin und tRNA ersetzt, der 5 µL DIG-

markierte RNA-Sonde (50 ng/μL) enthielt. Die Hybridisierung erfolgte im Wasserbad bei 70 °C über Nacht.

4% PFA [40 g PFA; 100 mL 10X PBS; 900 mL a.d.; 80 μL NaOH; pH 7,4]

HM [50 % Formamid; 5X SSC; 0,1 % Tween 20; 1M Zitronensäure (pH 6); a.d.]

HM mit Heparin und tRNA [50 μg/mL Heparin, 500 μg/mL tRNA]

Tag 2: Waschen und Inkubation mit Anti-DIG

Am nächsten Tag wurde der HM mit der Sonde vorsichtig abgenommen. Dann wurden die Larven in jeweils 1 mL der folgenden, auf 70 °C vorgewärmten, Lösungen bei 70 °C für 10 min gewaschen:

- 100 % HM (ohne Heparin und tRNA)
- 75 % HM (ohne Heparin und tRNA) – 25 % 2X SSC
- 50 % HM (ohne Heparin und tRNA) – 50 % 2X SSC
- 25 % HM (ohne Heparin und tRNA) – 75 % 2X SSC
- 100 % 2X SSC

Es folgten 2 Waschritte für 30 min in vorgewärmten 0,2X SSC bei 70 °C.

Anschließend wurden die Larven in jeweils 1 mL der folgenden Lösungen bei Raumtemperatur für 10 min auf einem horizontalen Rollenschüttler gewaschen:

- 75 % 0,2X SSC – 25 % PBS-Tween
- 50 % 0,2X SSC – 50 % PBS-Tween
- 25 % 0,2X SSC – 75 % PBS-Tween
- 100 % PBS-Tween

Danach folgte die Inkubation der Embryonen für 3-4 h bei Raumtemperatur in frischem Blockpuffer auf dem Rollenschüttler, der nach der Inkubation wieder abgenommen wurde. Der Anti-DIG Antikörper wurde 1:5000 in Blockpuffer verdünnt und je 1 mL zu den Larven gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C auf dem Schüttler über Nacht.

20X SSC [175,3 g NaCl; 88,2 g Na-Citrat; mit a.d. auf 1000 mL; pH 7]

Tag 3: Waschen und Färben

Die Antikörper-Lösung wurde abgenommen und die Larven 6-mal für je 15 min in PBS-Tween auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Das PBS-Tween wurde komplett entfernt und die Larven 3-mal für je 5 min in alkalischem Tris-Puffer auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Larven in 12-Well Platten überführt, der Puffer abgenommen und die Färbelösung dazu gegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht war. Dann wurden die Larven 2-mal in PBS-Tween gewaschen und in PFA fixiert. Die Ergebnisse der Färbungen wurden auf Fotos dokumentiert (s. 3.3.1).

Färbelösung [20 mL Alkaline-Tris-Puffer; 70 μ L BCIP; 90 μ L NBT]

3.3.3 Messung der genspezifischen Marker mit qRT-PCR

Die Darm- (*fabp2*) und Lebermarker (*fabp10*) wurden ebenfalls mit Hilfe der qRT-PCR (3.2.5) gemessen. Bei den Darm- und Lebermarkern wurde jedoch die *SYBR Green*-Methode angewandt. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der eine hohe Affinität zu doppelsträngiger DNA hat und in diese interkaliert. Somit steigt mit der Zunahme an doppelsträngiger DNA im Ansatz das Fluoreszenzsignal an, da zunehmend mehr *SYBR Green* eingelagert wird. Für diese Methode mussten der Probenansatz und das Temperaturprofil angepasst werden (Abbildung 15).

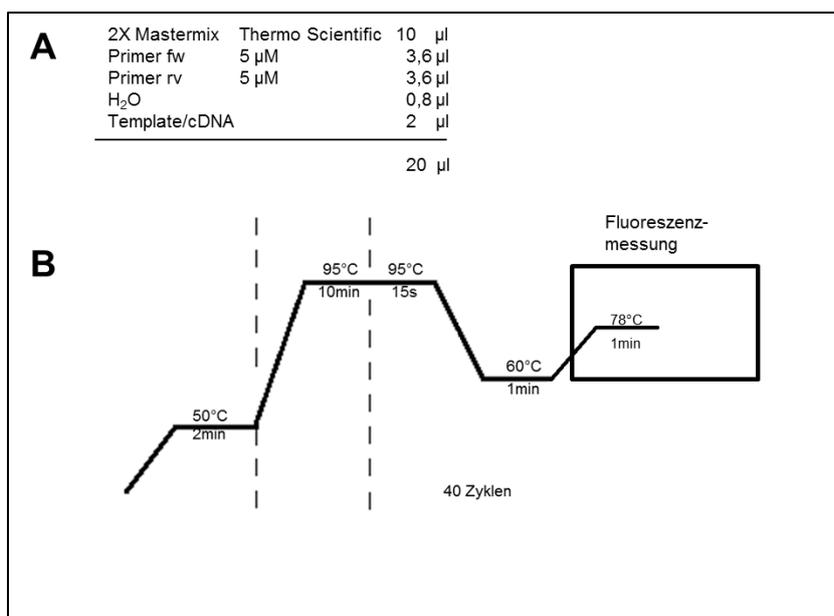


Abbildung 15: DNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR

A: Probenansatz, B: Temperaturprofil

3.3.4 Feeding behaviour

Das Essverhalten der Fischlarven wurde an d8 durch die Fütterung mit fluoreszierenden *Beads* untersucht. Dazu wurden je 10 Larven mit 2 mL Medium und 0,0025 % Fluoresbrite™ Plain YG 2.0 Micron Microspheres in ein 15 mL-Eppendorf-Tube gegeben und für 1 h bei 30 °C und Licht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Larven mit Tricain (300 mg/L) betäubt und für 24 h in PFA fixiert. Danach wurden sie in PBS-Tween gewaschen und die Anzahl der *Beads* im Verdauungstrakt der Fische mikroskopisch ermittelt.

3.3.5 Nilrot-Färbung

Nilrot (Nilblau-Oxazon) ist ein lipophiler fluoreszierender Phenoxazin-Farbstoff, der an Lipid -Einschlüsse bindet und damit dem Nachweis von Adipozyten dient [Greenspan et al 1985].

Vor der Färbung wurden die an d8 in PFA fixierten Fischlarven einmal in PBS-T gewaschen. Das Nilrot wurde 1:2000 in PBS-T verdünnt und jeweils 2 mL der Färbelösung auf die Larven gegeben. Die Inkubation erfolgte für 2-3 h bei 30 °C auf dem Rollenschüttler. Anschließend erfolgte die mikroskopische Auswertung, bei der die Adipozyten ausgezählt und die Größe der Augendurchmesser der Larven als Entwicklungsparameter bestimmt wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung des *Knockdowns* von *mtch2*

Da es sich bei den Morpholinos *mtch2* MO1 und *mtch2* MO2 um Morpholinos handelt, die an die für das Gen *mtch2* codierende mRNA binden und damit das Splicing der prä-mRNA verhindern, wurde davon ausgegangen, dass die Expression des Gens nach deren Injektion in die Zebrafischembryonen verringert ist. Um dies zu überprüfen, wurden an den Tagen 1, 4 und 8 nach der MO-Injektion RNA-Proben extrahiert, die für die Messung der *mtch2*-Expression über qRT-PCR dienen. In Abbildung 16 ist die Expression von *mtch2* bei verschiedenen Injektionsmengen und Zeitpunkten im Vergleich zu einem Kontroll-MO (Ctrl MO) dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass mit beiden Morpholinos ein *Knockdown* der *mtch2*-Expression erzielt werden kann, der sich in der Effektivität jedoch stark unterscheidet. Bei MO1 wurde eine Reduktion der Expression auf 25 % (A), bei MO2 auf 65% (B) erzielt. Während bei MO1 beide Injektionsmengen einen messbaren *Knockdown* erzielten, konnte bei MO2 der *Knockdown* nur mit dem höheren Volumen detektiert werden. Der *Knockdown*-Effekt ist bei beiden MOs bis Tag 8 sichtbar, nimmt aber im Vergleich zu Tag 1 deutlich ab.

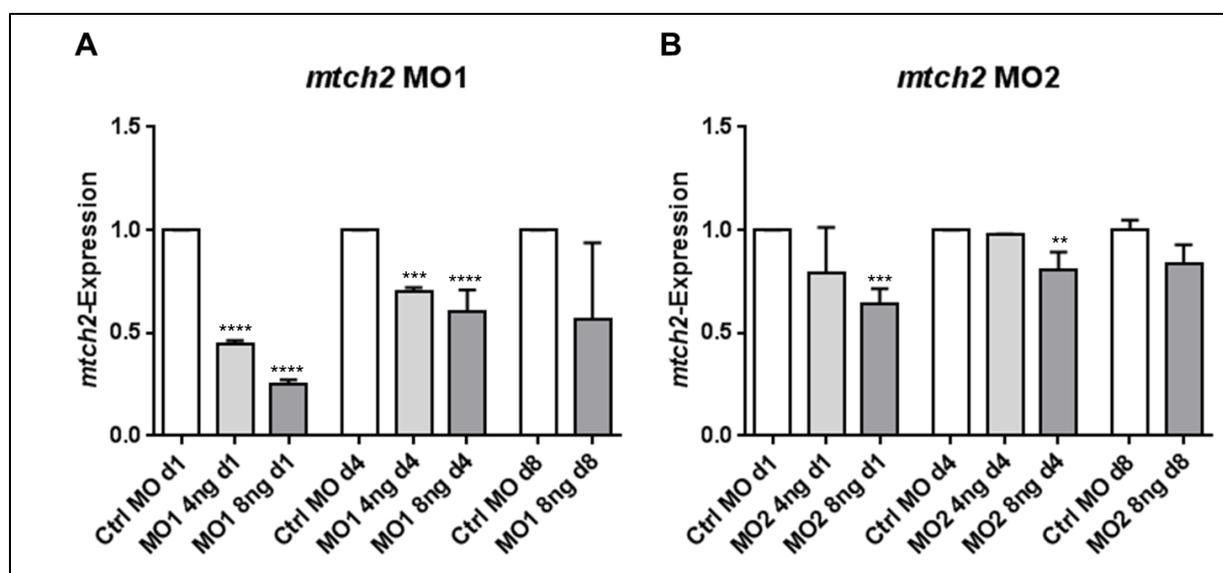


Abbildung 16: *mtch2*-Expression nach Morpholino-Injektion

A: *mtch2*-Expression bei MO1-injizierten Fischen, B: *mtch2*-Expression bei MO2-injizierten Fischen

Die Ergebnisse sind als MW+SEM dargestellt.

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ (student's t-test)

Diese Ergebnisse lassen sich zudem durch die Auswertung des Knockdowns über Agarosegelelektrophorese verdeutlichen (Abbildung 17). Bei beiden MOs zeigt sich der Unterschied der Genexpression zwischen Kontroll-MO-injizierten und *mtch2* MO-injizierten Fischen in der Bandenintensität sowohl bei Primer *zfmtch2* rv1, der im Exon 2 platziert ist, als auch bei Primer *zfmtch2*-intron1-rv, der im Intron 1 platziert ist (Abbildung 10). Bei Primer *zfmtch2* rv1 nimmt die Bandenintensität der injizierten Proben im Gegensatz zur Kontrolle ab. Das ist darauf zurückzuführen, dass das Intron1 durch das verhinderte *Splicing* der prä-mRNA im Gen erhalten bleibt. Die hier eingesetzte PCR-Methode ist jedoch nicht geeignet um DNA-Fragmente dieser Größe nachzuweisen, so dass nur die DNA vervielfältigt wird, bei der das *Splicing* zur reifen RNA funktioniert hat. Da dieser Anteil durch den *Knockdown* gesenkt ist, äußert sich das in der geringeren Bandenstärke. Bei Primer *zfmtch2*-intron1-rv hingegen nimmt die Bandenstärke der injizierten Proben zu. Da dieser Primer direkt im Intron1 platziert ist, werden in der PCR Produkte gebildet, die das Intron1 und damit den Knockdown enthalten. Das Signal der Kontrolle ist deutlich schwächer oder gar nicht vorhanden, da das Intron1 hier heraus-*gesplitt* wird.

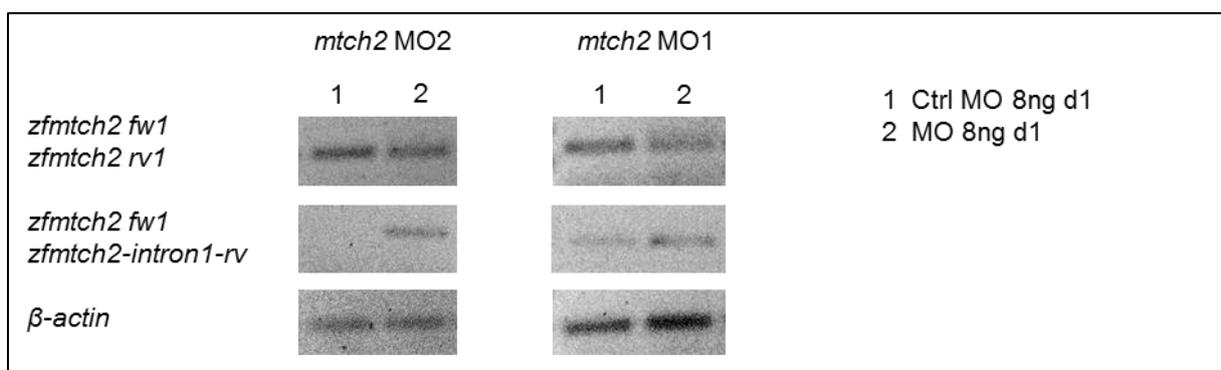


Abbildung 17: Auswertung des *mtch2*-Knockdowns über Agarosegelelektrophorese

4.2 Bewertung des Phänotyps der MO-injizierten Fische

Die Bewertung des Phänotyps der MO-injizierten Fische erfolgte an den Tagen 1, 4 und 8 nach der MO-Injektion. Die Abbildung 18 zeigt exemplarisch den Phänotyp der Fische nach den Injektionen mit *mtch2* MO1 im Vergleich zu Kontroll-MO injizierten Fischen. Dabei sind in (A)-(C) die mit dem Kontroll-MO, in (D)-(F) die mit dem *mtch2* MO1-injizierten Fische zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die MO1-injizierten Fische einen spezifischen Phänotyp aufweisen, der sich nicht von dem der Kontrollen unterscheidet.

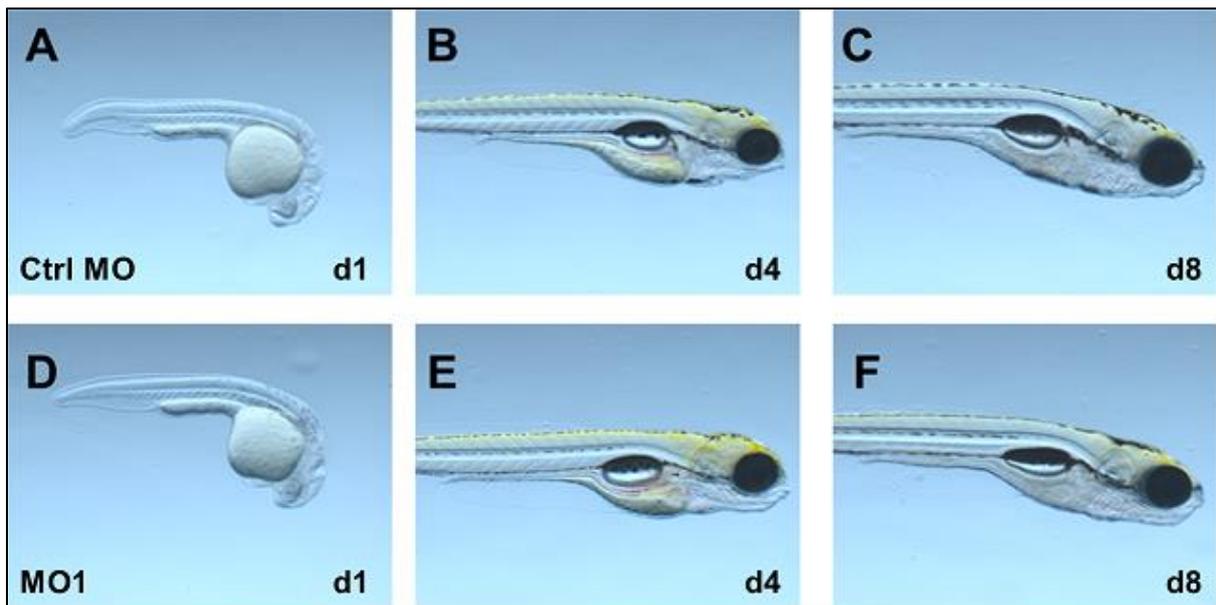


Abbildung 18: Phänotyp *mtch2* MO1 im Vergleich zum Kontroll-MO

A: Kontroll-MO d1 50-fache Vergrößerung, B: Kontroll-MO d4 56-fache Vergrößerung, C: Kontroll-MO d8 56-fache Vergrößerung, D: MO1 d1 50-fache Vergrößerung, E: MO1 d4 56-fache Vergrößerung, F: MO1 d8 56-fache Vergrößerung

In Abbildung 19 ist exemplarisch der Phänotyp der Fische nach den Injektionen mit *mtch2* MO im Vergleich zu Kontroll-MO-injizierten Fischen dargestellt. Auch hier konnte festgestellt werden, dass sich der spezifische Phänotyp der MO2-injizierten Fische nicht von dem der Kontrollen unterscheidet.

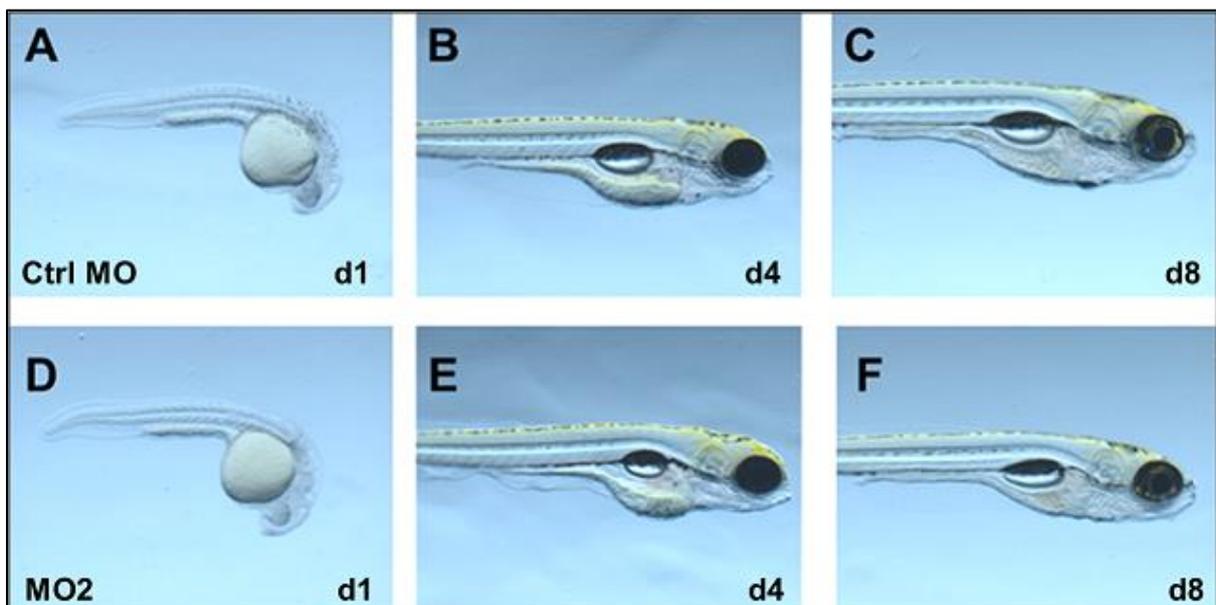


Abbildung 19: Phänotyp *mtch2* MO2 im Vergleich zum Kontroll-MO

A: Kontroll-MO d1 50-fache Vergrößerung, B: Kontroll-MO d4 56-fache Vergrößerung, C: Kontroll-MO d8 56-fache Vergrößerung, D: MO2 d1 50-fache Vergrößerung, E: MO2 d4 56-fache Vergrößerung, F: MO2 d8 56-fache Vergrößerung

Auffälligkeiten fanden sich jedoch bei den mit *mtch2* MO2-injizierten Embryonen, vorwiegend an Tag 1 und Tag 4 nach der Injektion. Diese Embryonen bildeten neben dem oben gezeigten Phänotyp einen unspezifischen Phänotyp aus, der sich durch vermehrte Missbildungen wie Ödeme, Krümmungen des Körpers und Fehlbildungen im Bereich des Kopfes, der Augen und der Schwimmblase äußerte (Abbildung 20). Diese unspezifischen Effekte waren dabei so gravierend, dass sie zum Absterben der Fische führten.



Abbildung 20: Unspezifischer Phänotyp der mit MO2 injizierten Fische

A: Ödembildung Embryo d4, B: Körperkrümmungen Embryo d4, C: Fehlbildungen im Bereich des Kopfes und der Augen Embryo d1

Besonders deutlich wird dieser Umstand beim Vergleich der Anzahl der Fischlarven an Tag 8 nach der Injektion (Abbildung 21). Bei *mtch2* MO1 sinkt die Zahl der überlebenden Fische an Tag 8 auf etwa 50 % der Ausgangszahl, was dem Wert der Kontrolle entspricht (A). Bei *mtch2* MO2 hingegen sind an Tag 8 nur noch etwa 10 % der injizierten Fische übrig, was deutlich unter dem Kontrollwert liegt (B).

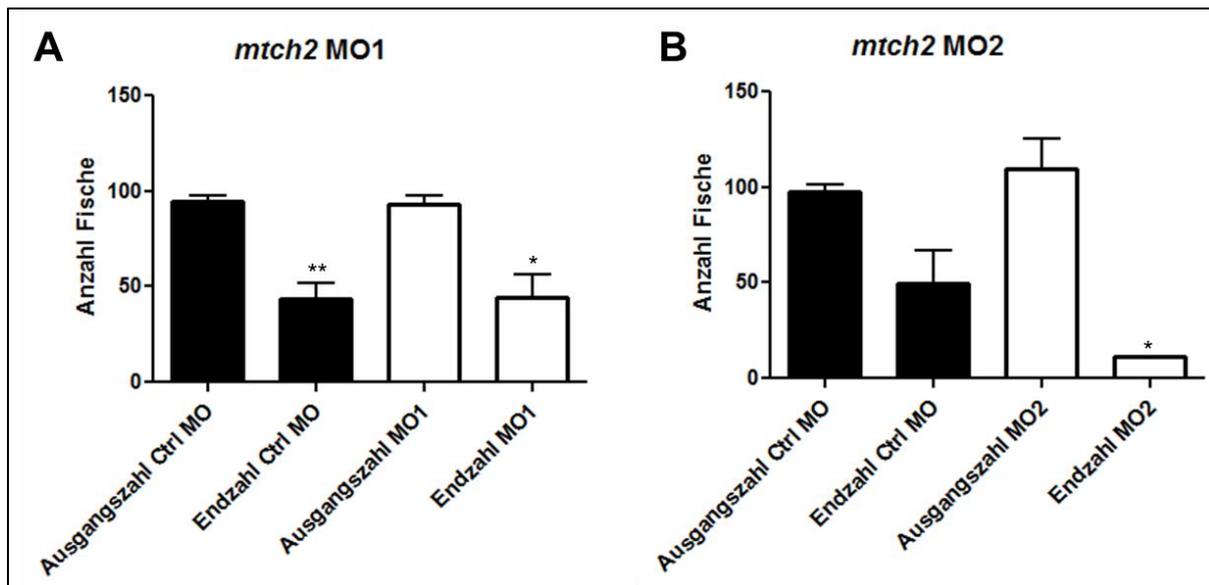


Abbildung 21: Vergleich der Absterberaten der Fische bei beiden Morpholinos

A: Absterberate der Fische bei Injektionen mit MO1, B: Absterberate der Fische bei Injektionen mit MO2

Die Ergebnisse sind als MW+SEM dargestellt.

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ (student's t-test)

4.3 Auswirkungen des Knockdowns von *mtch2* auf Leber und Darm

Um die Auswirkungen des Knockdowns von *mtch2* auf Leber und Darm der Fische zu untersuchen wurden die spezifischen Marker *fabp2* und *fabp10* eingesetzt. Bei *fabp2* handelt es sich um das *Fatty acid-binding protein 2*, auch bekannt als *Intestinal-type fatty acid-binding protein*, das als spezifischer Marker für den Darm eingesetzt wurde. Bei *fabp10* handelt es sich um das *Fatty acid-binding protein 10*, das als spezifischer Marker für die Leber eingesetzt wurde. Die entsprechenden Organe wurden zum einen mit der Methode der *In situ* Hybridisierung angefärbt, zum anderen wurde die Expression der spezifischen Marker mittels qRT-PCR überprüft, um etwaige Unterschiede zwischen *mtch2* MO-injizierten und Kontroll-MO-injizierten Fischen zu identifizieren.

4.3.1 Herstellung und Überprüfung der DIG-markierten RNA-Sonden

Beide Gene, die als Marker eingesetzt werden sollten, lagen als Plasmide im *pCRII-TOPO*-Vektor vor. Für die Herstellung der späteren *antisense*-Sonden wurde ein Restriktionsverdau mit *XhoI*, für die *sense*-Sonden mit *HindIII* durchgeführt. Dieser wurde über Agarosegelelektrophorese überprüft (Abbildung 22 (A)). Die linearisierten

Plasmide wurden anschließend zur Synthese von RNA-Sonden verwendet, welche DIG-markiert wurden. Zur Überprüfung der Markierungseffizienz wurde ein DotBlot als Detektionsmethode eingesetzt. Dafür wurden 2 Verdünnungen (50 ng/µl und 5 ng/µl) der DIG-markierten RNA und eine Kontroll-RNA (*myoD*) auf eine Nylonmembran aufgebracht. Der Nachweis der eingebauten DIG-Moleküle erfolgte durch einen anti-DIG-Antikörper. Bei allen hergestellten Sonden konnte so die Farbreaktion auf der Nylonmembran und damit ihre Funktionalität nachgewiesen werden (Abbildung 22(B)).

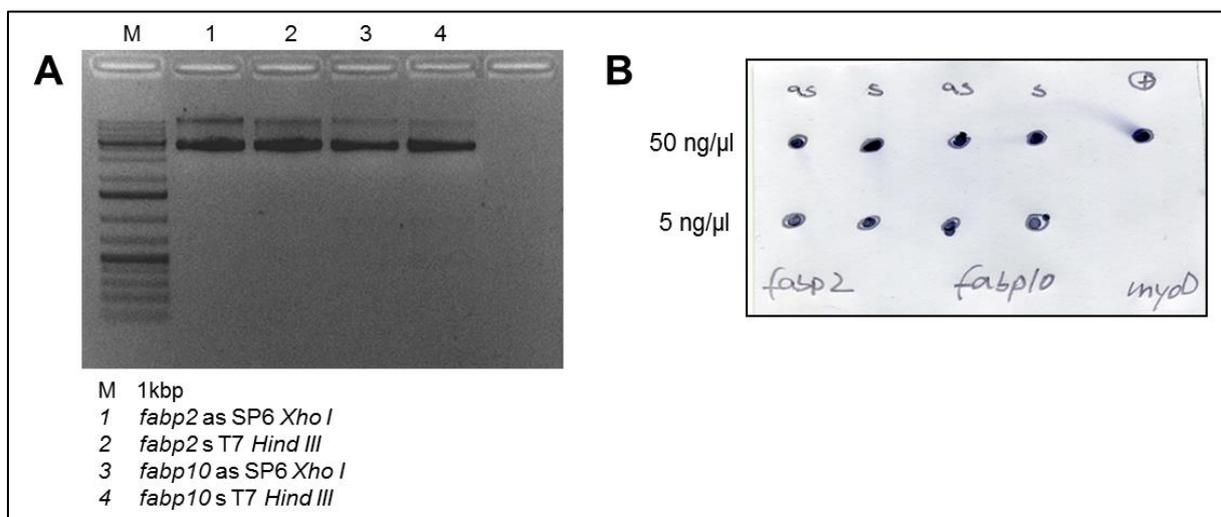


Abbildung 22: Etablierung der RNA-Sonden für die *In situ* Hybridisierung

A: Restriktionsverdau der Plasmide, B: DotBlot der DIG-markierten RNA-Sonden

4.3.2 Etablierung *In situ* Hybridisierung

Die Etablierung der *In situ* Hybridisierung wurde mit nicht-injizierten Fischlarven der Entwicklungsstufe Tag 4 durchgeführt (Abbildung 23). (A) und (B) zeigen den Einsatz der Sonden *fabp2*, (C) und (D) den Einsatz der Sonden *fabp10*. Die *antisense*-Sonden sind komplementär zur mRNA der spezifischen Gene und binden an diese, während die *sense*-Sonden nicht an diese binden können. Daher dienen die *sense*-Sonden als Kontrollen und rufen keine Färbung der spezifischen Organe hervor. Bei den *antisense*-Sonden hingegen konnte die Färbung in den für die Marker spezifischen Organen nachgewiesen werden.

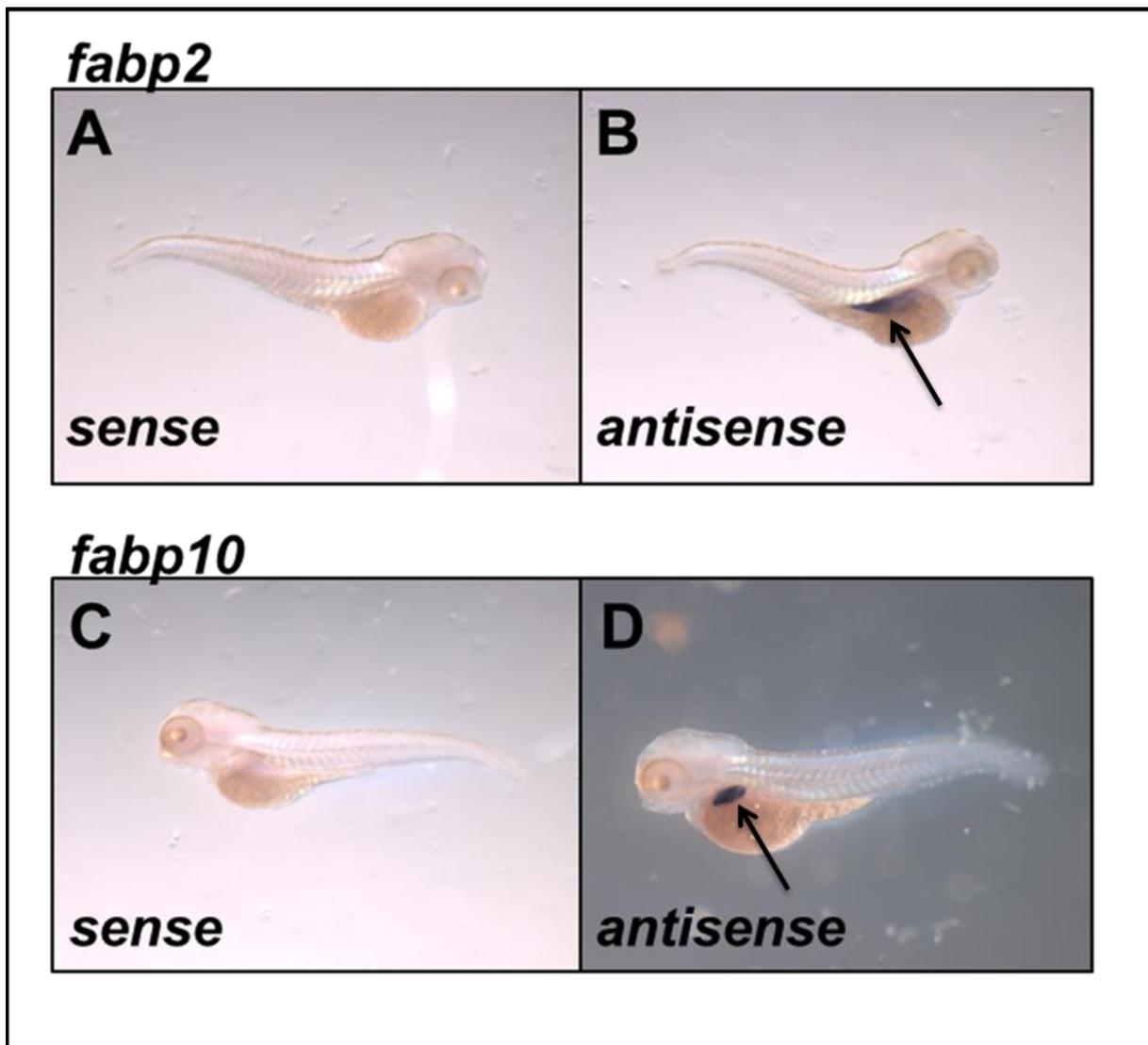


Abbildung 23: Etablierung der *In situ* Hybridisierung

A: *fabp2* sense, B: *fabp2* antisense, C: *fabp10* sense, D: *fabp10* antisense

Der Pfeil in B deutet auf die durch *In situ* Hybridisierung gefärbte Darmregion des Fisches, in D auf die durch *In situ* Hybridisierung gefärbte Leber des Fisches hin.

4.3.3 Auswirkungen der MO-Injektionen auf die *fabp2*-Expression

Da *mtch2* bei Zebrafischen auch im Darm exprimiert wird, sollte festgestellt werden, ob ein *Knockdown* des Gens Auswirkungen auf die Entwicklung des Darmes der mit *mtch2* MO-injizierten Fische hat. Hierzu wurden Fischlarven der Entwicklungsstufe Tag 4 mit der Methode der *In situ* Hybridisierung untersucht. Dabei wurden die *fabp2*-Sonden eingesetzt, die für den Darm spezifisch sind. In Abbildung 24 sind die Färbungen des Darms *mtch2* MO-injizierter Fischlarven im Vergleich zur Kontrolle exemplarisch dargestellt. Die Färbungen des Darms wirken bei den Fischen der Entwicklungsstufe Tag 4, die mit den *mtch2* Morpholinos behandelt wurden im

Vergleich zur Kontrolle schwächer. Des Weiteren wirkt die gesamte Region des Darmes schmaler. Die generelle Entwicklung der Fische an Tag 4 scheint hingegen nicht beeinflusst zu sein, wie anhand der nicht veränderten Größe zu erkennen ist. Die Veränderungen im Bereich des Darmes konnten sowohl bei *mtch2* MO1 als auch bei *mtch2* MO2 festgestellt werden und lassen vermuten, dass *mtch2* in die Entwicklung des Darmes involviert ist.

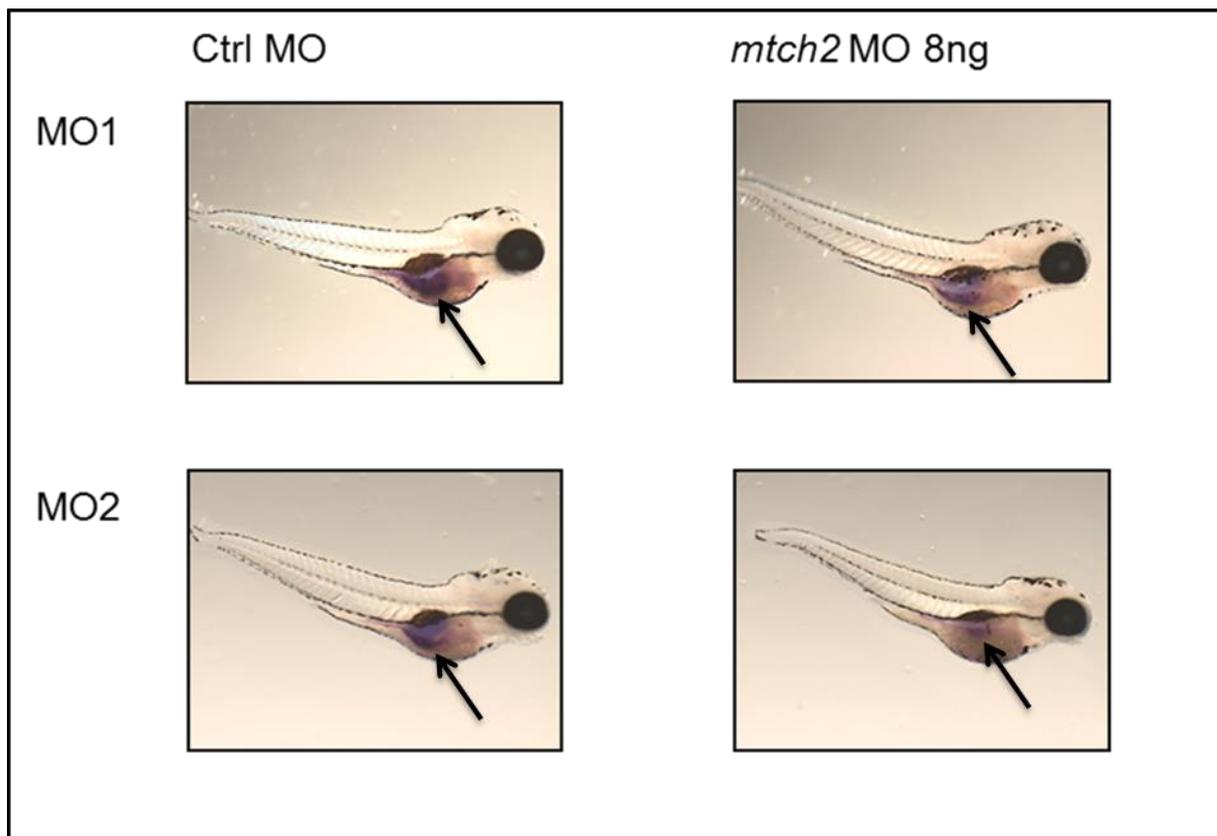


Abbildung 24: *In situ* Hybridisierung *fabp2*

Die Pfeile deuten auf die durch *In situ* Hybridisierung gefärbte Darmregion der Fische hin.

4.3.4 Auswirkung der MO-Injektion auf die *fabp10* und *I-fabp*-Expression

Für die Untersuchungen der Auswirkungen des *mtch2*-Knockdowns auf die Entwicklung der Leber wurde wie in 4.3.3 beschrieben verfahren. Hierbei wurden in der *In situ* Hybridisierung jedoch die für die Leber spezifischen Sonden *fabp10* eingesetzt. Abbildung 25 zeigt die Färbungen der Leber *mtch2* MO-injizierter Fischlarven im Vergleich zur Kontrolle. Analog zur Färbung des Darms konnte auch bei der Färbung der Leber festgestellt werden, dass diese an Tag 4 der Entwicklung bei den mit *mtch2* MO-injizierten Fischen schwächer ist und die Leber kleiner wirkt, als bei den Kontroll-MO-injizierten Fischen.

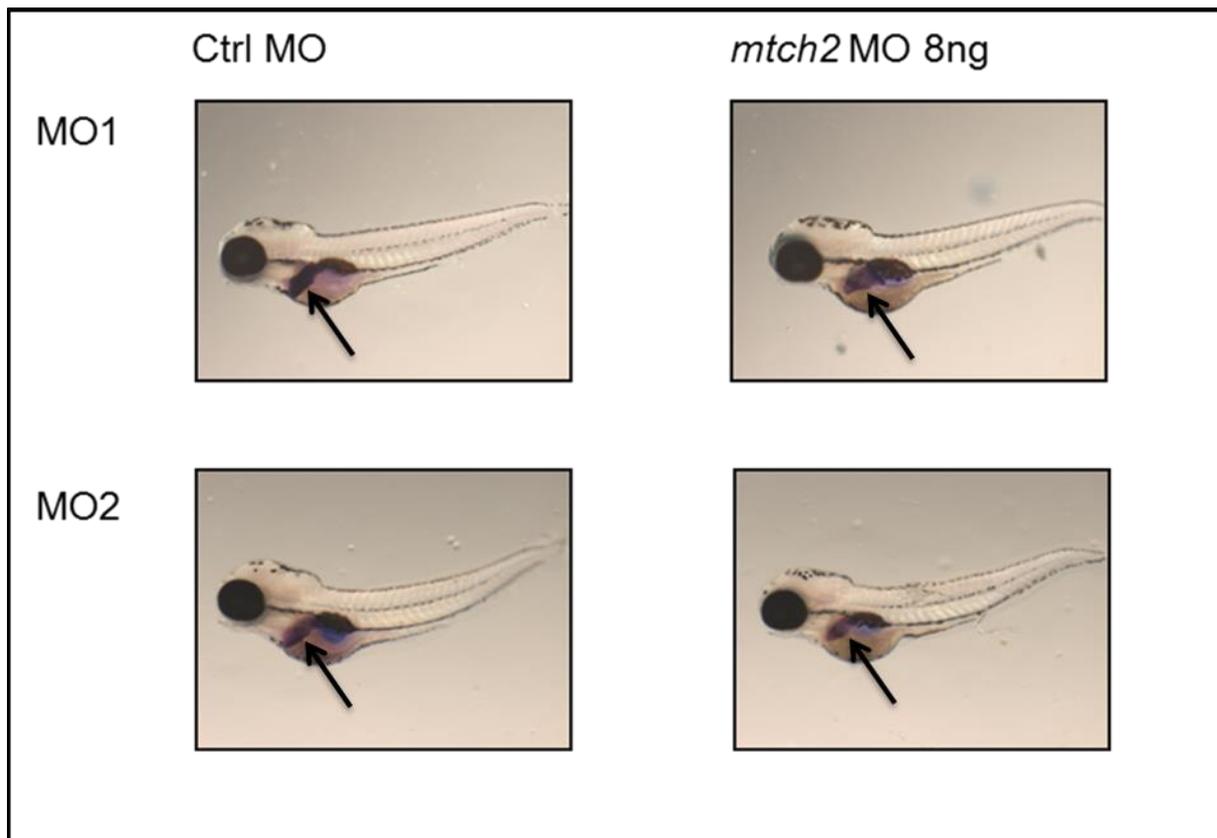


Abbildung 25: *In situ* Hybridisierung *fabp10*

Die Pfeile deuten auf die durch *In situ* Hybridisierung gefärbte Leber der Fische hin.

Zusätzlich wurde die Expression von *fabp10* und einem weiteren spezifischen Lebermarker *l-fabp* über qRT-PCR gemessen. Bei *l-fabp* handelt es sich um das *liver-type fatty acid-binding protein*. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 für *mtch2* MO1 und in Abbildung 27 für *mtch2* MO2 dargestellt. Auch hier konnte für beide *mtch2* MOs die verringerte Expression von *fabp10* und *l-fabp* an Tag 4 der Entwicklung gezeigt werden, wodurch die Ergebnisse aus den *In situ* Hybridisierungen bestätigt wurden.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass *mtch2* neben der Darmentwicklung auch an der Entwicklung und Bildung der Leber beteiligt ist.

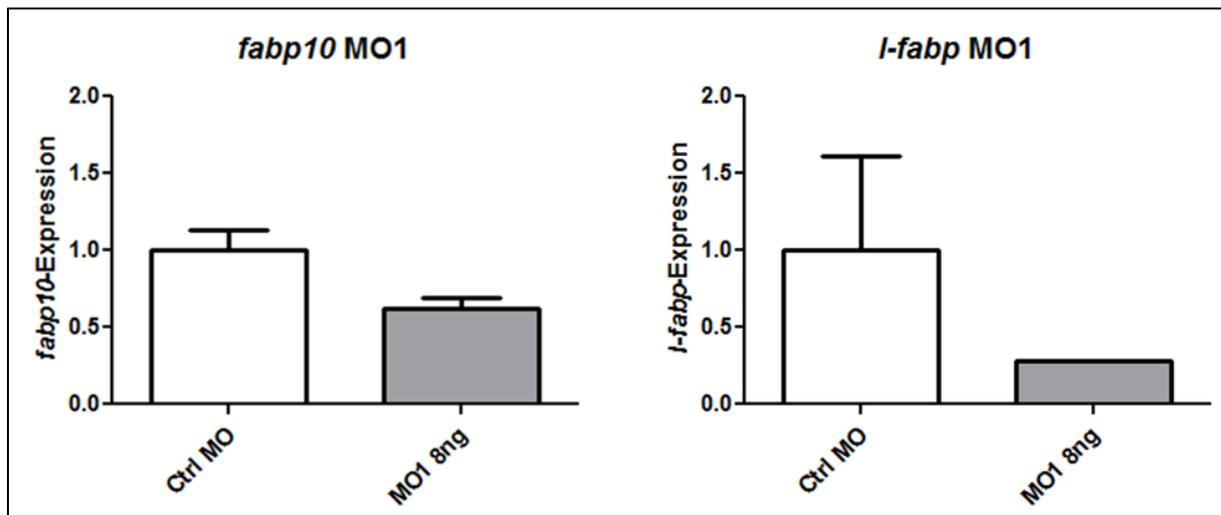


Abbildung 26: *fabp10*- und *I-fabp*-Expression *mtch2* MO1

Die Ergebnisse sind als MW+SEM dargestellt.

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ (student's t-test)

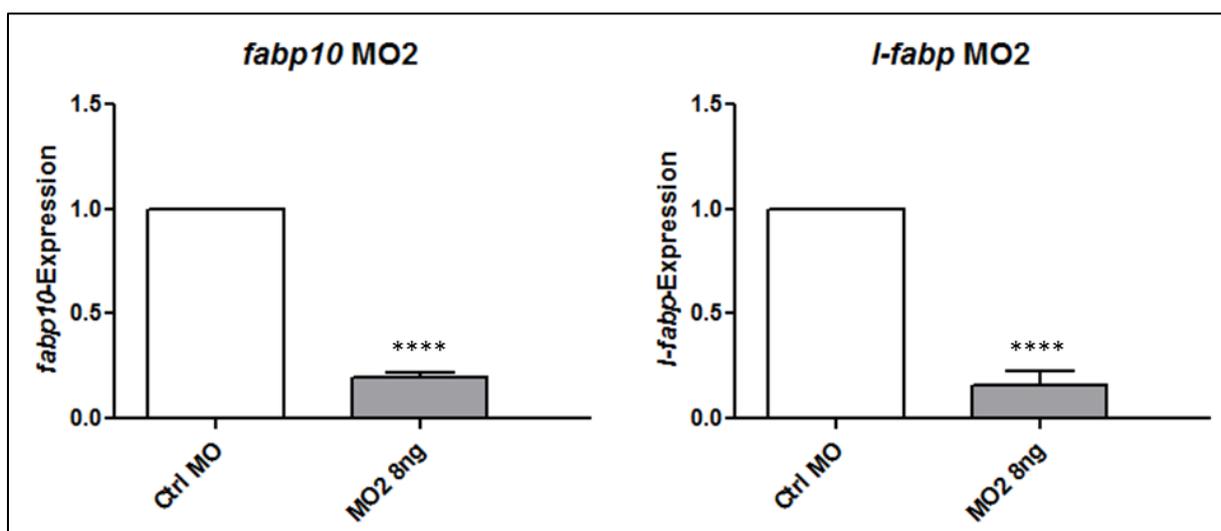


Abbildung 27: *fabp10*- und *I-fabp*-Expression *mtch2* MO2

Die Ergebnisse sind als MW+SEM dargestellt.

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ (student's t-test)

4.4 Adipozytenentwicklung

Um den Einfluss des *Knockdowns* von *mtch2* auf die Entwicklung des Fettgewebes zu untersuchen, wurde die Adipozytenentwicklung bei Fischen der Entwicklungsstufe Tag 8 nach der Injektion näher betrachtet. Dazu wurden die Adipozyten mit dem

Farbstoff Nilrot angefärbt und deren Anzahl mikroskopisch ausgezählt. Die Anzahl der Adipozyten in *mtch2* MO-injizierten Fischlarven und Kontroll-MO-injizierten Fischen sind in Abbildung 28 dargestellt. Während sich bei *mtch2* MO1 die Tendenz zu einer geringeren Anzahl von Adipozyten im Vergleich zur Kontrolle erkennen lässt, ist dieser Unterschied bei *mtch2* MO2 signifikant. Das deutet darauf hin, dass *mtch2* neben der Entwicklung von Leber und Darm möglicherweise eine Rolle bei der Fettgewebsentwicklung in Zebrafischen spielt.

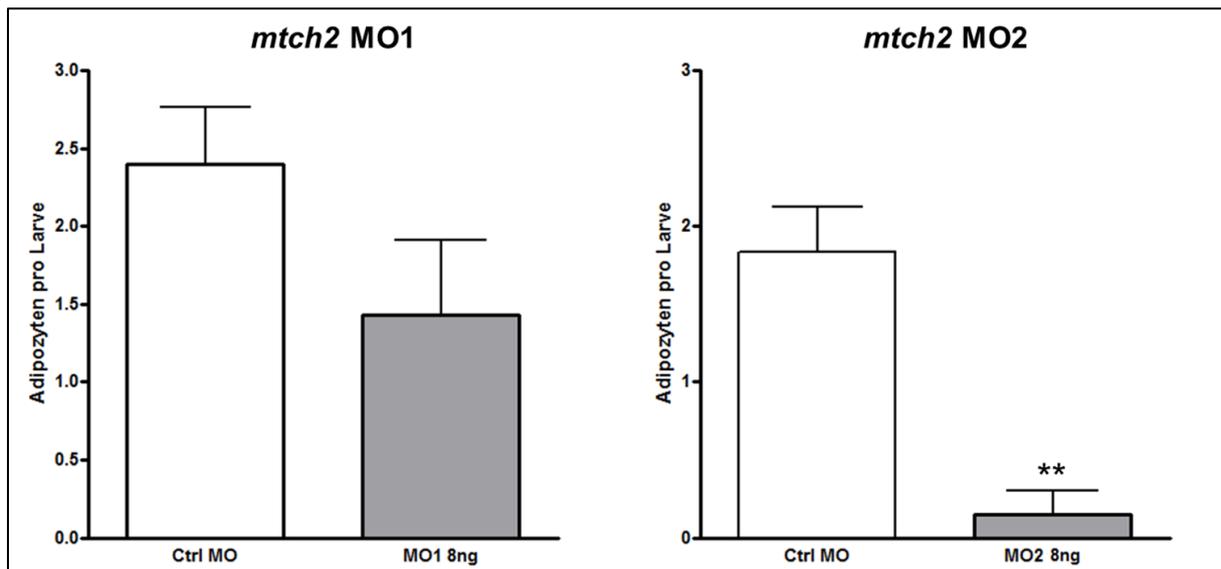


Abbildung 28: Adipozytenanzahl *mtch2* MO- und Kontroll- MO-injizierter Fischlarven

Die Ergebnisse sind als MW+SEM dargestellt.

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ (student's t-test)

4.5 Augendurchmesser

Im Zuge der Nilrotfärbung wurde der Augendurchmesser der *mtch2* MO- und Kontroll-MO-injizierten Fischlarven als ein Parameter der generellen Entwicklung bestimmt (Abbildung 29). Bei beiden *mtch2* Morpholinos konnte gezeigt werden, dass der Augendurchmesser der MO-injizierten Fischlarven an Tag 8 der Entwicklung signifikant kleiner ist als bei den Kontroll-MO-injizierten Fischen. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Fische mit dem *mtch2*-Knockdown an Tag 8 der Entwicklung insgesamt kleiner beziehungsweise unterentwickelt sind.

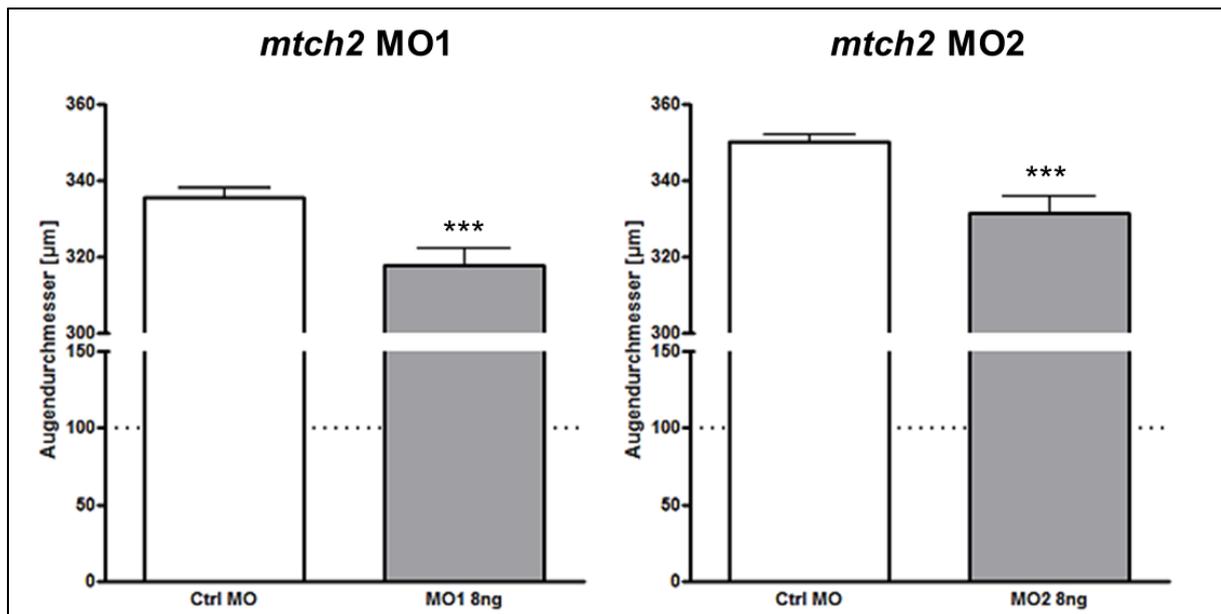


Abbildung 29: Augendurchmesser MO- und Kontroll-MO-injizierter Fischlarven

Die Ergebnisse sind als MW+SEM dargestellt.

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ (student's t-test)

4.6 Essverhalten der Fischlarven

Da die bisherigen Untersuchungen der Fische mit dem *Knockdown* von *mtch2* ergaben, dass diese in ihrer Entwicklung gehemmt und auch die Adipozytenbildung erniedrigt war, sollte untersucht werden, ob sich ein Zusammenhang mit dem Essverhalten der Fische darstellen lässt. Das Essverhalten der Fische wurde dazu durch die Fütterung mit fluoreszierenden *Beads* an Tag 8 der Entwicklung näher untersucht. Die Anzahl der im Verdauungstrakt ausgezählten *Beads* ist in Abbildung 30 dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass die Injektion der *mtch2* Morpholinos und der damit induzierte *Knockdown* von *mtch2* zu keinem signifikanten Unterschied in der Anzahl der durch die Fische aufgenommenen *Beads* führte. Daraus kann geschlossen werden, dass der *Knockdown* von *mtch2* keine Auswirkungen auf das Essverhalten der Fische hat.

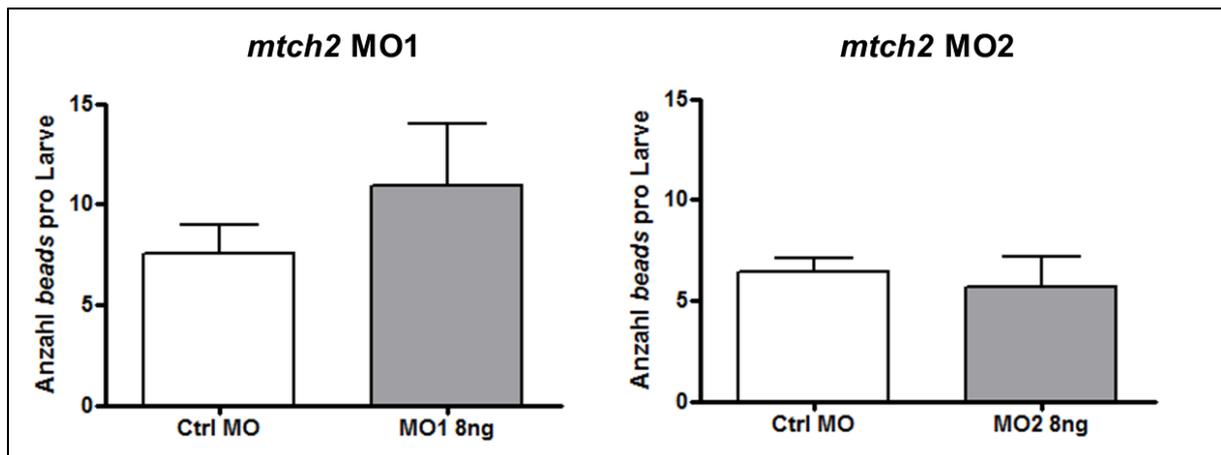


Abbildung 30: Essverhalten MO- und Kontroll-MO-injizierter Fischlarven

Die Ergebnisse sind als MW+SEM dargestellt.

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ (student's t-test)

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Masterarbeit sollte der *Knockdown* von *mtch2* mit Hilfe zweier *Splice*-Morpholinos im Zebrafisch etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich der *Knockdown* von *mtch2* in den Zebrafischen mit beiden *mtch2* Morpholinos effizient induzieren lässt. Wie erwartet, führte die Injektion der Morpholinos im Zebrafisch dazu, dass das Intron1 nicht korrekt aus der prä-mRNA entfernt werden konnte, was eine Änderung der Proteinsequenz nach sich zog und damit dazu führte, dass *mtch2* nicht funktional war. Dabei konnte jedoch festgestellt werden, dass der erzielte *Knockdown*-Effekt mit der Zeit abnimmt. Das ist dadurch zu erklären, dass die Morpholinos jeweils in das 1-2-Zellstadium der Embryonen injiziert werden und sich die effektive Konzentration mit dem Wachstum der Embryonen nach jeder Zellteilung verdünnt, so dass sich der inhibitorische Effekt schließlich aufhebt. Somit dauert die resultierende Inhibierung der Genexpression, im Gegensatz zur gezielten Inaktivierung bei *Knockouts*, nur für einige Tage an [Begemann, 2004; Eisen/Smith, 2008].

Obwohl beide *mtch2* MOs den *Knockdown* des Gens herbeiführten, unterschieden sich diese deutlich in ihrer Effizienz, bei *mtch2* MO2 traten zudem neben dem spezifischen Phänotyp (auch *Knockdown*- oder *Morphant*-Phänotyp) unspezifische Nebeneffekte auf. In der Literatur finden sich für dieses Phänomen unterschiedliche Erklärungen. Die Injektion von Morpholinos in höherer Konzentration kann zu unspezifischen Nebeneffekten, z.B. dem Zelltod im zentralen Nervensystem führen, die auf Interaktionen mit anderen zellulären Komponenten beruhen [Begemann, 2004]. Daher ist es ratsam, bei jeder vorgenommenen Injektion an Zebrafischen einen Kontroll-Morpholino im selben Volumen zu injizieren, um auszuschließen, dass die Injektion eines hohen Volumens und nicht der Morpholino selbst den Phänotyp hervorruft. Des Weiteren treten bei der Anwendung von Morpholinos so genannte *Off-target* Effekte auf. Darunter versteht man die Möglichkeit, dass ein Morpholino die Funktion eines anderen Gens, anstatt die des Zielgens inhibiert [Eisen/Smith, 2008]. Die unspezifischen neuronalen Defekte, die in 15-20 % der durchgeführten Morpholinoexperimente im Zebrafisch auftreten, sind wahrscheinlich zurückzuführen auf die Aktivierung von *p53* und der daraus resultierenden *p53*-induzierten Apoptose. Der Mechanismus über den Morpholinos *p53* aktivieren ist dabei noch ungeklärt [Robu, 2007]. Der unspezifische Phänotyp, der dadurch auftritt, wird auch als

„Monster“-Phänotyp bezeichnet [Ekker/Larson, 2001; Woods/Schier, 2008]. Er zeichnet sich durch verkürzte und krumme Schwänze, massive Körperkrümmungen sowie kleine Köpfe und Augen der Fische aus [Bedell, 2011]. Die mit dem *mtch2* MO2 injizierten Fische zeigten in etwa die gleichen Auffälligkeiten. Daher wäre es möglich, dass diese Fische neben dem *Knockdown* von *mtch2*, der über qRT-PCR nachgewiesen wurde, auch den unspezifischen Phänotyp durch die Aktivierung von *p53* enthalten könnten. Da letzterer zum Absterben der Fische führte, was in der erhöhten Absterberate der *mtch2* MO2-injizierten Fische deutlich wurde, könnte es möglich sein, dass damit Fische, die gleichzeitig den effizienteren *Knockdown* von *mtch2* enthielten, abstarben und sich so die niedrigere *Knockdown*-Effizienz bei diesem Morpholino ergab.

In Folge der Injektion von beiden *mtch2* MOs konnten Veränderungen der Organe Leber und Darm festgestellt werden. Diese wirkten bei der Untersuchung mit den Leber- bzw. Darm-spezifischen Markern durch *In situ* Hybridisierung insgesamt kleiner und schmaler und die verringerte Expression konnte zudem über qRT-PCR nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse gehen mit den Erkenntnissen über die Expression von *mtch2* während der frühen Zebrafischentwicklung einher und bestätigen damit die Hypothese, dass *mtch2* möglicherweise in die Entwicklung dieser Organe involviert ist. Der Augendurchmesser, der als allgemeines Maß für die Entwicklung der Fische herangezogen wurde, zeigte zudem, dass die Fische, die mit den *mtch2* MOs injiziert wurden, an Tag 8 der Entwicklung allgemein kleiner bzw. unterentwickelt im Vergleich zur Kontrolle waren. Dagegen konnte diese Unterentwicklung an Tag 4 nach der Injektion noch nicht festgestellt werden. Die Beobachtungen passen damit zu den Erkenntnissen von Zaltsman *et al*, die zeigen konnten, dass die Embryonen von homozygoten *MTCH2/MIMP Knockout* Mäusen deutlich kleiner sind, als die Embryonen des Wildtyps [Zaltsman, 2010].

Ein Grund für die beobachtete Unterentwicklung der Fische könnte möglicherweise ein Einfluss von *mtch2* auf das Essverhalten der Fische sein. Eine geringere Nahrungsaufnahme könnte dabei mit einem verzögerten Wachstum der Fische assoziiert sein. Die durchgeführten Analysen ergaben jedoch keinen Zusammenhang zwischen Unterentwicklung und Essverhalten der Fische, da dieses nach der Injektion der *mtch2* Morpholinos nicht beeinflusst war. Die Expression von *mtch2* konnte neben Darm und Leber auch im Gehirn von adulten Zebrafischen

nachgewiesen werden. Eine Expression im Gehirn und damit im Hypothalamus lässt die Annahme zu, dass *mtch2* in die zentrale Regulation des Essverhaltens involviert ist. Dieser Umstand konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden und passt damit zu den Ergebnissen von Schmid *et al*, die hohe Expressionen von *MTCH2* im Hypothalamus von *Zucker diabetic fatty rats* und *Zucker lean rats* zeigen konnten, aber keinen Zusammenhang mit dem Phänotyp und dem Übergewicht der *Zucker diabetic fatty*-Ratten [Schmid, 2012]. Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass nicht die Nahrungsaufnahme selbst die Entwicklung der Fische beeinträchtigt.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Verwertung der Nahrung, also die Resorption von Nährstoffen in den Fischen gestört ist. Interessanterweise konnte, wie oben beschrieben, ein Einfluss von *mtch2* MO-Injektion auf die Entwicklung und damit möglicherweise auch auf die Funktion von Leber und Darm der Fische nachgewiesen werden. Sowohl die Leber als auch der Darm nehmen eine essentielle Funktion im Metabolismus ein. Während im Darm die einzelnen Bestandteile der Nahrung zerlegt werden, ist die Leber als zentrales Stoffwechselorgan an einer Vielzahl von Stoffwechselvorgängen beteiligt. Im Darm erfolgt die Zerlegung von Fetten zu Glycerin und Fettsäuren, von Eiweißen zu Aminosäuren und von Kohlenhydraten zu Einfachzuckern. Die Resorption der Nährstoffe erfolgt im Dünndarm, wobei Einfachzucker und Aminosäuren durch die Darmwand in das Blutgefäßsystem aufgenommen und Fettsäuren und Glycerin vom Lymphsystem aufgenommen werden [Kleesattel, 2000]. Nährstoffe, die aus dem Darm in das Blut aufgenommen werden, gelangen über die Pfortader zur Leber. Dort findet die Produktion lebenswichtiger Eiweißstoffe (z.B. Gerinnungsfaktoren), die Verwertung von Nahrungsbestandteilen (Speicherung Glykogen und Vitamine) und die Gallenproduktion statt [Goeser, 2015]. Die Leber spielt zudem eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel und auch in den Adipozyten unterliegen die Lipide einem ständigen Auf- und Abbau. Die Bestandteile für die Lipogenese liefern Lipoproteine, die mit dem Blut transportiert werden. Glycerine und Fettsäuren werden von den Fettzellen aufgenommen und dort wieder zu Triglyceriden aufgebaut [Kezze].

Die Adipozyten machen den Großteil der Fettgewebsmasse eines Individuums aus und sind die zentralen Figuren des Lipidmetabolismus und der Energiehomöostase. Es wird angenommen, dass sie aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen

hervorgehen, die dem Mesoderm entstammen. Im Verlauf des Differenzierungsprozesses entsteht ein teilungsfähiger Präadipozyt, der unter adäquaten Stimuli zum ausgewachsenen Adipozyten heranreift [Gesta, 2007]. Bereits in der frühen präadipozytären Phase steuern nukleäre Transkriptionsfaktoren der *CAAT enhancer binding protein (C/EBP)* Familie und der *peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ)* mittels Regulation einer kaskadenartigen ablaufenden adipozytenspezifischen Genexpression die Adipogenese [Rosen/MacDougald, 2006]. Flynn *et al* untersuchten die Adipozytenbildung in Zebrafischen in Abhängigkeit der Ontogenese und des Fütterungszustandes der Tiere. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten sie die Lokalisation der Adipozyten in der viszeralen Kavität auf der rechten Körperseite der Fische zeigen. Zusätzlich wurden Fettdepots in der subkutanen Lage entlang des Rückens und der bauchseitigen Linie sowie kleinere Lipidtröpfchen in Leber und Darmepithel lokalisiert. Die Fetteinlagerungen in den Fischen entwickelten sich unter normalen Fütterungsbedingungen, konnten mit Hilfe einer Hungerkur über mehrere Tage reduziert und über erneute Fütterung wieder neu gebildet werden [Flynn, 2009]. Das verdeutlicht, dass unter anderem die exogene Nahrungszufuhr einen wichtigen Regulator der Adipogenese darstellt. Auf Grund dieser Erkenntnisse könnte man davon ausgehen, dass *mtch2* möglicherweise keine Funktion in den Adipozyten selbst übernimmt, dafür aber in Darm und Leber, wodurch es indirekt Einfluss auf die Nährstoffverfügbarkeit und damit auf die Adipozytenbildung nehmen könnte. Es muss jedoch beachtet werden, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse keine Schlüsse auf die Funktion von *mtch2* im Fettgewebe von adulten Tieren zulassen, da alle Untersuchungen in juvenilen Fischen durchgeführt wurden. Hierfür wären weiterführende Untersuchungen nötig.

Einen weiteren interessanten Ansatz liefern Semova *et al*, die zeigen konnten, dass die Darmmikrobiota die Aufnahme von Fettsäuren und die Bildung von Lipidtröpfchen im Darmepithel und der Leber von Zebrafischen fördert. Die Anwesenheit von Nahrung führt dabei zu einer Anreicherung von Bakterien des Phylum *Firmicutes* [Semova, 2012]. In den letzten Jahren wird auch zunehmend über den Zusammenhang von Adipositas und einer veränderten Darmmikrobiota beim Menschen diskutiert. Auch hier konnte gezeigt werden, dass sich die bakterielle Zusammensetzung der Darmmikrobiota von schlanken und adipösen Menschen

unterscheidet. Das Mikrobiom der schlanken Personen wies im Allgemeinen eine größere Bakterienvielfalt auf, vor allem die Spezies *Bacteroides* kam bei adipösen Probanden in geringerem Maße vor [Le Chatelier, 2013]. Ob *mtch2* möglicherweise die Zusammensetzung der Darmmikrobiota beeinflusst, ist bisher nicht bekannt und müsste durch weiterführende Untersuchungen geprüft werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ein *Knockdown* des Zielgens *mtch2* mit den beiden in der Arbeit eingesetzten Morpholinos im Zebrafisch induziert werden konnte, wobei einer der beiden Morpholinos unspezifische Nebeneffekte herbeiführte. Der *Knockdown* von *mtch2* führt bei beiden Morpholinos zu Unterentwicklungen der Leber und des Darms und einer reduzierten Adipozytenbildung in den Zebrafischen. Die Tiere waren nach den Morpholinoinjektionen insgesamt kleiner und unterentwickelt, wobei dieser Umstand nicht mit dem Essverhalten der Fische in Zusammenhang gebracht werden konnte. Somit lässt sich die Aussage treffen, dass *mtch2* eine Rolle bei der Entwicklung von Darm und Leber im Zebrafisch spielt und damit indirekt an der generellen Entwicklung sowie der Fettgewebsentwicklung beteiligt ist. Die molekularen Mechanismen, welche diese Funktion von *mtch2* vermitteln, bedürfen weiterer Untersuchungen.

Es ist anzumerken, dass der *Knockdown* eines Gens, der über qRT-PCR auf molekularer Ebene nachgewiesen wird, nicht automatisch eine Reduktion der gleichen Qualität auf Proteinebene bedeutet [Eisen/Smith, 2008]. Daher könnte der *Knockdown* auf Proteinebene zusätzlich untersucht werden. Bei der Verfügbarkeit eines passenden Antikörpers, der sich gut für Untersuchungen *in vivo* eignet, kann dieser eine hochauflösende Ansicht der Proteinexpression geben [Hutchinson/Eisen, 2006]. Andernfalls kann die Expression auch über die Methode des *Western Blots* beurteilt werden [Eisen/Smith, 2008].

Um sicherzustellen, dass der beobachtete Phänotyp der Fische auch tatsächlich auf dem *Knockdown* von *mtch2* beruht, sollte zudem ein *Rescue*-Versuch durchgeführt werden. Darunter versteht man die „Rettung“ des Phänotyps durch eine zweite zusätzliche Injektion der mRNA des Zielgens [Eisen/Smith, 2008]. Die Embryonen, die nur mit dem Morpholino injiziert wurden, werden dann mit den Embryonen verglichen, die mit Morpholino und mRNA injiziert wurden [Little/Mullins, 2004]. Tritt der Phänotyp nicht mehr auf und resultiert der *Rescue*-Versuch im Phänotyp des Wildtyps [Bedell, 2011], so handelt es sich um einen für den *Knockdown* des Zielgens spezifischen Phänotyp, andernfalls könnte es sich um einen ungewollten *Off-target* Nebeneffekt handeln.

Die eventuelle Unterentwicklung der Fische durch mangelnde Resorption oder Umsetzung der Nährstoffe könnte weiter untersucht werden. Dazu könnte beispielsweise die Darstellung von fluoreszierenden Fettsäureanaloga *in vivo* genutzt werden [Semova, 2012].

Ein weiterer wichtiger Schritt wäre die Beobachtung der Auswirkung des *mtch2-Knockdowns* in adulten Zebrafischen, um mögliche Spätfolgen zu detektieren. Denkbar wären auch Untersuchungen in anderen Tiermodellen, zum Beispiel der *MTCH2/MIMP Knockout* Maus. Um die Funktion von *mtch2* weitergehend zu analysieren, würde sich die Durchführung eines Tunel-Assays zur Identifizierung apoptotischer Zellen anbieten.

Literaturverzeichnis

Abrams, P. *et al*: *Metabolic effects of obesity causing disease in childhood*, Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 18, 2011, S. 23-27.

Bangsow, T. *et al*: *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)* in: Schrimpf, G.(Hrsg.): *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 3. Auflage, Spektrum Akad.-Verlag, Heidelberg 2002, S. 163.

Begum F. *et al*: *Comprehensive literature review and statistical considerations for GWAS meta-analysis*, Nucleic Acids Research Band 40, Nr 9, 2012, S. 3777–3784.

Bernhard, F. *et al*: *Functional relevance of genes implicated by obesity genome-wide association study signals for human adipocyte biology*, Diabetologia 56, 2013, S. 311-322.

Birbrair, A.: *Role of Pericytes in Skeletal Muscle Regeneration and Fat Accumulation*, Stem Cells and Development 22 (16), 2013, S. 2298–314.

Clarke, P; Tyler, K. L.: *Apoptosis in animal models of virus-induced disease*, Nature Reviews Microbiology 7, 2009, S. 144-155.

Coll, A. P. *et al*: *The hormonal control of food intake*, Cell 129, 2007, S. 251-262.

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

Ekker, S. C., Larson J. D.: *Morphant technology in model developmental systems*, Genesis 30, 2001, S. 89-93.

Feero, W. *et al*: *Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease*, N Engl J Med 363, 2010,, S. 166-176.

Flynn, E. J.: *Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (Danio rerio)*, Journal of Lipid Research 50, 2009, S. 1641-1652.

Gesta,S. *et al*: *Developmental origin of fat: tracking obesity to its source*, Cell 131, 2007, S. 242-256.

Greenspan, P. et al: *Nile red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets*, J Cell Biol 100, 1985, S. 965–973.

Gross, A.: *Mitochondrial Carrier Homolog2: A Clue to Cracking the BCL-2 Family Riddle?*, Journal of Bioenergetics and Biomembranes Vol.37 No.3, 2005, S. 113-119.

Hajer, G. R. et al: *Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases*, Eur Heart J 29, 2008, S. 2959-2971.

Hebebrand, J. et al: *Genetische Ursachen der Adipositas*, Bundesgesundheitsblatt 53, 2010, S. 674-680.

Hutchinson S. A., Eisen, J. S.: *Islet1 and Islet2 have equivalent abilities to promote motoneuron formation and to specify motoneuron subtype identity*, Development 133, 2006, S. 2137-2147.

Inzant, J. G., Weintraub, H.: *Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis*, Cell 36, 1984, S. 1007-1015.

Kiess, W. et al: *Clinical aspects of obesity in childhood and adolescence*, Obes Rev. 2, 2001, S.29-36.

Kimmel, C. B. et al: *Stages of Embryonic Development of the Zebrafish*, Developmental Dynamics 203, 1995, S. 253-310.

Kleesattel, W.: *Biologie, Pocket Teacher Abi*, Cornelsen, Berlin 2000, S.51f.

Kulyté, A. et al: *MTCH2 in Human White Adipose Tissue and Obesity*, J Clin Endocrinol Metab 96(10), 2011, S. E1661- E1665.

Kurth, B.-M., Schaffrath Rosario, A.: *Die Verbreitung von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland*, Bundesgesundheitsblatt 50, 2007, S. 736-743.

Landgraf, K. et al: *Functional characterization of potential regulators of adipogenesis using the zebrafish model*, 2013, Poster zur Präsentation auf dem *Endocrine Society's Annual Meeting 2013*, noch nicht veröffentlicht.

Le Chatelier, E. et al: *Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers*, Nature 500, 2013, S. 541-546.

Lenard, N. R.; Berthoud H. R.: *Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes*, Obesity (Silver Spring) 16 (Suppl 3), 2008, S. 11-22.

Little, S. C., Mullins, M. C.: *Twisted gastrulation promotes BMP signaling in zebrafish dorsal-ventral axial patterning*, Development 131, 2004, S. 5825-5835.

Mühlhardt, C.: *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*, 4. Auflage, Elsevier GmbH, München 2003, S. 73ff.

Qiagen: *Benutzerhandbuch. RNeasy® Mini Kit*, 2012.

Rai, K. et al: *Dnmt3 and G9a Cooperate for Tissue-specific Development in Zebrafish*, Journal of biological chemistry Vol. 285 No. 6, 2010, S. 4110-4121.

Raj, M., Kumar, R.: *Obesity in children & adolescents*, Indian J Med Res. 132(5), 2010, S. 598–607.

Robinson, A. et al: *Mitochondrial carrier homolog 2 (MTCH2): The recruitment and evolution of a mitochondrial carrier protein to a critical player in apoptosis*, Experimental Cell Research 318, 2012, S.1316-1323.

Robu, M. E. et al: *p53 activation by knockdown technologies*, PLoS Genet 3,2007, e78.

Rosen,E.D.; MacDougald, O. A.: *Adipocyte differentiation from the inside out*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 2006, S. 885-896.

Schwarz, M. et al: *Mitochondrial carriers and pores: Key regulators of the mitochondrial apoptotic program?*, Apoptosis, 2007, S. 869-876.

Shin, A. C.; Berthoud, H. R.: *An expanded view of energy homeostasis: neural integration of metabolic, cognitive, and emotional drives to eat*, Physiol Behav 97, 2009, S. 572-580.

Thisse, C.; Thisse, B.: *High resolution in situ hybridization on whole-mount zebrafish embryo*, Nature protocols Vol. 3 No. 1, 2008, S. 59-69.

Trayhurn, P. et al: *Adipose tissue and adipokines-energy regulation from the human perspective*, J Nutr 136, 2006, S. 1935S-1939S.

Willer, C.J. *et al*: *Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation*, Nat Genet 41, 2009, S. 25-34.

Woods I. G., Schier A. F.: *Targeted mutagenesis in zebrafish*, Nat Biotechnol 26, 2008, S. 650-1.

Zaltsman, Y. *et al*: *MTCH2/MIMP is a major facilitator of tBID recruitment to mitochondria*, Nat Cell Biol 12(6), 2010, S. 553-562.

Quellenverzeichnis

Bedell, V. M. *et al*: *Lessons from morpholino-based screening in zebrafish*, „Online im Internet“, <<http://bfg.oxfordjournals.org/content/early/2011/07/10/bfgp.elr021.full>>, 10.07.2011 [10.04.2015, 08:32 Uhr]

Begemann, G.: *Der Zebrafisch als genetischer Modellorganismus*, „Online im Internet“, <<http://www.zebrafish.uni-konstanz.de/einleitung.pdf>>, 01.07.2004 [08.04.2015, 09:11 Uhr]

Begemann, G.: *“Knockdowns” statt “Knockouts”: Gezielte Blockade der Proteinsynthese durch Morpholinos*, „Online im Internet“, <<http://www.zebrafish.uni-konstanz.de/morpholino.htm>>, 01.07.2004 [08.04.2015, 10:02 Uhr]

Goeser, T.: *Grundlagen der Leberfunktion*, „Online im Internet“, <<http://www.lebertransplantation.eu/grundlagen-der-leberfunktion/All-Pages.html>>, 13.02.2015 [23.04.2015, 13:12 Uhr]

Kezze, F.: *Lipidstoffwechsel - Lipide im Blut*, „Online im Internet“, <http://www.uni-koeln.de/med-fak/biochemie/biomed/wisspro/fatima_kezze.html> [23.04.2015, 14:32 Uhr]

Schmid, P. M. *et al*: *Expression of fourteen novel obesity-related genes in zucker diabetic fatty rats*, *Cardiovascular Diabetology* 2012, „Online im Internet“, <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1475-2840-11-48.pdf>> [14.04.2015, 19:37 Uhr]

Semova, I. *et al*: *Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish*, *Cell Host Microbe* 2012 12(3), „Online im Internet“, <[http://www.cell.com/cell-host-microbe/abstract/S1931-3128\(12\)00274-0?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312812002740%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/cell-host-microbe/abstract/S1931-3128(12)00274-0?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312812002740%3Fshowall%3Dtrue)>, 13.09.2013 [24.04.2015, 01:37 Uhr]

Yoganathan, P. *et al*: *Nutritional regulation of genome-wide association obesity genes in a tissue-dependent manner*, *Nutrition & Metabolism* 2012, „Online im Internet“, <<http://www.nutritionandmetabolism.com/content/9/1/65>> [14.04.2015, 15:00 Uhr]

Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kinder- und Jugendalter (AGA): *Leitlinie. Therapie der Adipositas im Kindes- und Jugendalter*, 2009 <<http://www.aga.adipositas-gesellschaft.de/fileadmin/PDF/Leitlinien/Leitlinie-AGA-S3-2009.pdf>>

WHO: *Factsheet. Obesity and overweight*, Stand 01/2015
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> [07.04.2015, 9:32 Uhr]

<http://kik.uniklinikum-leipzig.de/kikcms.site,postext,childhood-obesity-antje-koerner.html> [13.04.2015, 20:32 Uhr]

http://kik.uniklinikum-leipzig.de/kikcms.site,postext,research-topics-k,a_id,1130.html
[13.04.2015, 20:32 Uhr]

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y6C9> [07.04.2015, 9:00 Uhr]

<http://www.gene-tools.com/> [14.10.2014, 10:49 Uhr]

Bilder:

<http://www.zebrafisch.uni-konstanz.de/morpholino.htm> [25.02.2015, 13:00Uhr]

<http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=8706> [26.02.2015,22:00 Uhr]

<http://www.sandeepkhat.info/img/ZebrafishStages.jpg> [16.03.2015, 20:08 Uhr]

<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n2/images/nrmicro2071-f1.jpg> [08.04.2015,
08:08 Uhr]

[http://www.vet-magazin.com/tier-fotos/universitaeten/vetmeduni-vienna/Zebrafische/
Zebrafische.html](http://www.vet-magazin.com/tier-fotos/universitaeten/vetmeduni-vienna/Zebrafische/Zebrafische.html) [08.04.2015, 9:30 Uhr]

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Antje Körner für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Masterarbeit am Pädiatrischen Forschungszentrum in Leipzig und die Bereitstellung des äußerst spannenden und interessanten Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dabei meiner Betreuerin Frau Dr. Kathrin Landgraf für die hervorragende Unterstützung bei allen praktischen Arbeiten und der Erstellung des vorliegenden Manuskripts. Der gesamten AG Körner möchte ich für die freundliche Aufnahme in ihr Team und die stets angenehme Atmosphäre bei der Arbeit und im Labor danken.



Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Jürgen Mägert von der Hochschule Anhalt für die Übernahme der Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Allen voran möchte ich mich jedoch bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, und meinen Freunden für die Unterstützung während meiner gesamten Schul- und Studienzeit bedanken. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Das bearbeitete Thema wurde nicht schon früher im Rahmen einer anderen Arbeit behandelt und/oder anderweitig als Prüfungsarbeit eingereicht.

Ort, Datum

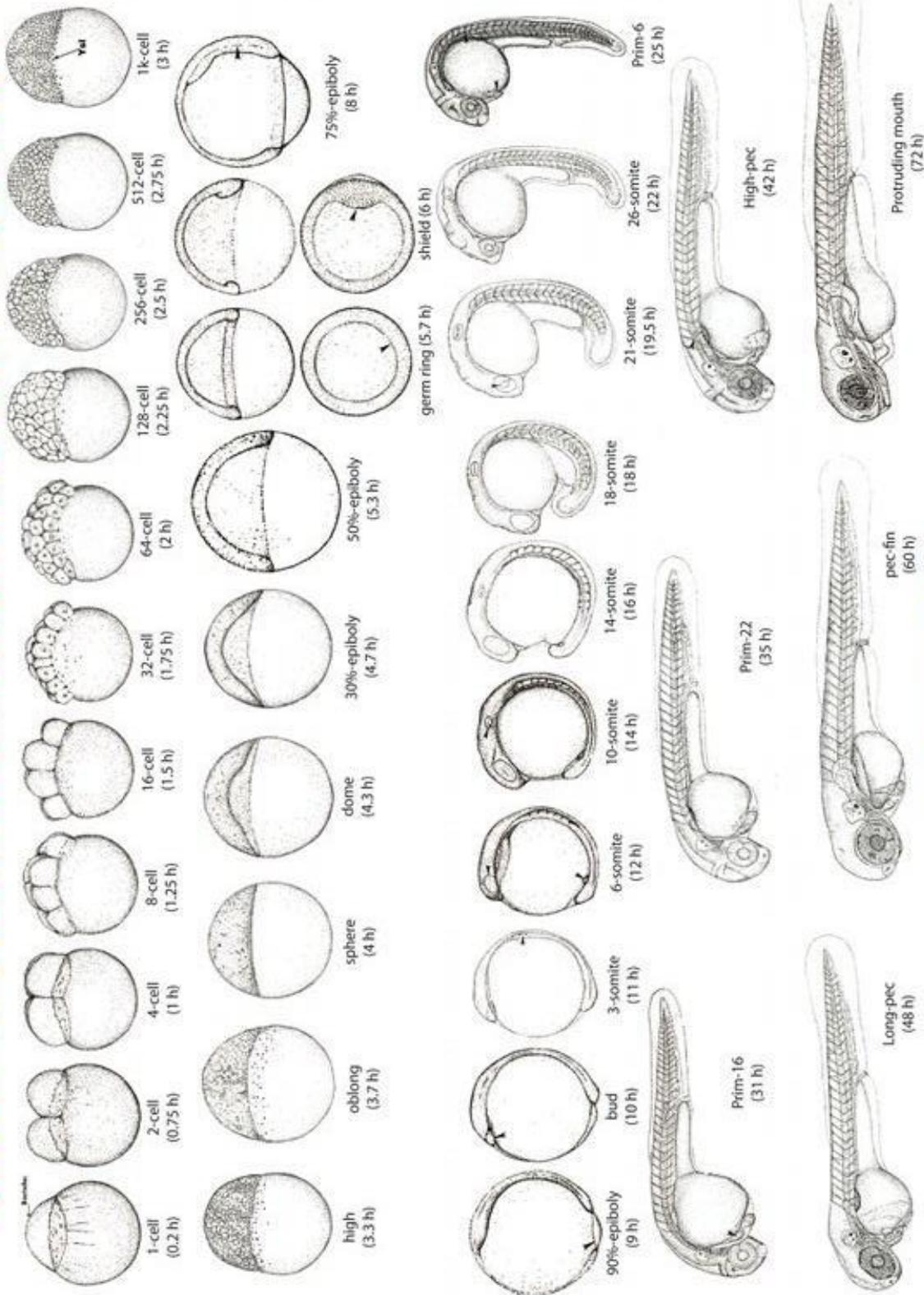
Ariane Strobach

Anhang

Stages of embryonic development of the zebrafish

69

STAGES OF EMBRYONIC DEVELOPMENT OF THE ZEBRAFISH



Source <http://www.uoregon.edu/~k12/zfk12.html>

Systems Biomed Lab, ECE, UCSB
sybil.ece.ucsb.edu

sandeepkhat@ece.ucsb.edu