

Aus dem
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin
Geschäftsführender Direktor : Prof. Dr. Hans Lehrach

Whole-mount in situ Hybridisierungs- screen im Zebrafisch von Homologen krankheitsinvolvierter Gene im Menschen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von: René Zeller
aus: Berlin

Referent: Prof. Dr. Friedrich Körber

Korreferent: Prof. Dr. Karl Sperling

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin

Promoviert am 11. April 2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung

1.1	Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie.....	2
1.2	Zebrafisch als Modellorganismus.....	3
1.3	Entwicklung des Zebrafischembryo.....	3
1.4	Genetisch bedingte Krankheiten im Menschen und die entsprechende Zebrafischmutante	
1.4.1	Blut/ Haematopoiesis.....	5
1.4.2	Herz.....	8
1.4.3	Niere.....	9
1.4.4	Zentrales Nervensystem.....	10
1.5	Physiologische Methoden im Zebrafisch.....	12
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	12

2. Material und Methoden

2.1	Identifikation von Zebrafisch Homologen zu menschlichen Krankheitsgenen: Datenbank Konstruktion und BLAST- Suche.....	13
2.2	Fischhaltung und Embryongewinnung.....	13
2.3	Anzucht von Klonen der cDNA Bibliothek RZPDp609.....	14
2.4	Plasmid Präparation-Minipreps und EcoR1 Verdau.....	16
2.5	Herstellung von Antisense-RNA-Sonden mittels DIG-Markierung.....	17
2.6	Manuelle in situ Hybridisierung der whole-mount Embryonen.....	17
2.6.1	Rehydratation der Embryonen.....	17
2.6.2	Prähybridisierung.....	18
2.6.3	Hybridisierung.....	18
2.6.4	Posthybridisierung.....	19
2.7	Automatisierte whole-mount in situ Hybridisierung.....	20

2.8	Photographische Dokumentation.....	20
2.9	Lösungen und Puffer.....	21
3.	Ergebnisse	
3.1	Einführung	22
3.2.1	Identifizierung von Homologen der Zebrafisch EST Bibliothek und beim Menschen in Krankheiten involvierten Genen.....	22
3.2.2	Charakterisierung von Zebrafisch Homologen mit menschlichen Krankheitsgenen auf der Basis von Gensequenzen.....	36
3.2.3	Charakterisierung von Zebrafisch Homologen mit menschlichen Krankheitsgenen auf der Basis von Krankheiten.....	36
3.3	Stadien der Zebrafischentwicklung.....	37
3.4	Whole-mount in situ Hybridisierungsscreen	
3.4.1	Screening von 150 Klonen (ESTs).....	37
3.4.2	Beschreibung der Expressionsmuster.....	42
3.4.2.1	Blut / Haematopoiesis.....	42
3.4.2.2	Herz.....	43
3.4.2.3	Niere.....	45
3.4.2.4	Zentrales Nervensystem.....	46
3.4.2.5	Andere Organe.....	48
4.	Diskussion	
4.1	Einführung.....	51
4.2	Sequenzanalyse.....	51
4.3	Bedeutung für die biomedizinische Forschung.....	52
4.4	Korrelation zwischen Expressionsmuster und Krankheit.....	53
4.4.1	Klon RZPDp609A0329.....	54
4.4.2	Klon RZPDp609P0227.....	55
4.4.3	Klon RZPDp609I0626.....	56
4.4.4	Klon RZPDp609B2017.....	56

4.4.5	Klon RZPDp609K1732.....	57
4.4.6	Klon RZPDp609L0444.....	57
4.4.7	Klon RZPDp609F2227	58
4.4.8	Klon RZPDp609J0811	59
5.	Zusammenfassung.....	60
6.	Literatur.....	61
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	69
8.	Danksagung.....	71