

## Kapitel 4. Diskussion

### 4.1 Einführung

Basierend auf dem Washington University EST Projekt wurden 186 Klone identifiziert, welche eine > 70% Ähnlichkeit (auf Aminosäurenebene) aufwiesen zu Genen, die im Menschen als in Krankheiten impliziert ausgewiesen sind. Für diese Klone wurde ein whole mount in-situ Hybridisierungsscreen durchgeführt. Ziel war eine Definition der räumlichen und zeitlichen Expression im sich entwickelnden Embryo des Zebrafischs. Daraus sollten Rückschlüsse gezogen werden auf funktionelle Gemeinsamkeiten zwischen der Beschreibung des Gens in Krankheiten und der "physiologischen" Funktion während der Entwicklung. Gemeinsam mit der gleichzeitig erfolgten chromosomalen Kartierung dieser Klone (radiation hybrid panel) (G. Otto, persönliche Mitteilung), erleichtert diese Arbeit die molekulare Aufklärung von induzierten Mutationen im Zebrafisch und dient damit auch der Erforschung der molekularen Ursachen von Krankheiten im Menschen. Für die weitergehende Charakterisierung der hier gezeigten cDNA Klone mit interessanter Musterbildung bieten sich neben der vollständigen Sequenzierung (im Gegensatz zu der bei EST unvollständigen "Ansequenzierung") die gezielte Überexprimierung (Injektionen) oder Ausschaltung durch knock-out (*morpholino*-Technik) an. Die entsprechende, im Zebrafisch neue Technologie ist seit kurzem verfügbar (Egger 2000).

Alternativ zur Morpholino-Technologie bietet sich *Antisense silencing* an. *Antisense silencing*, beruhend auf Abbau spezifischer mRNAs nach Injektion doppelsträngiger RNA, ist allerdings nur mit grossen Einschränkungen einsetzbar, da es nicht zuverlässig zu wirken scheint (Zhao et al. 2001).

### 4.2 Sequenzanalyse

Grundlage für die Untersuchung der Expression von Genen (Klonen) im sich entwickelnden Zebrafisch Embryo war eine am Max-Planck-Institut von M. Clark erstellte cDNA Bibliothek aus Gewebe von 24 hpf. Embryonen und Lebergewebe des adulten Zebrafischs (Clark et al.

2001). Das Ziel war es, Klone mit Homologien zu den Genen herauszusuchen, welche im Menschen als krankheitsimpliziert beschrieben sind.

Die hier untersuchte Bibliothek ist am RZPD (Ressource Zentrum des DHGP; [www.rzpd.de](http://www.rzpd.de)) unter der Nummer RZPDp609 (synonym MPMGp609) erhältlich und in Kooperation mit der Washington University St. Louis sequenziert (WashU-GSC Zebrafish EST project).

Die generierten Sequenzdaten sind im Internet frei zugänglich ([www.genetics.wustl.edu/fish\\_lab](http://www.genetics.wustl.edu/fish_lab)). In dieser Arbeit dienten sie als Grundlage der Klonauswahl, obwohl, bedingt durch die technologisierte Hochdurchsatz Sequenzierung, ca. 15–20% Fehler in der Zuordnung von Klontypen und Sequenz auftreten (Mitteilung Washington University Fish Lab).

Alle gepickten Klone wurden am Max-Planck-Institut daher einer nochmaligen Sequenzierung unterworfen; die so gewonnenen Daten wurden in dieser Arbeit verwendet.

Diese Vorgehensweise erklärt auch die Anzahl der Klone (46 von 186, d.h. 24%), welche am Ende von Tabelle 1 keine Zuordnung zu einem menschlichen Krankheitsgen erfahren haben.

Es handelt sich hierbei um gepickte Klone, deren Sequenz sich als falsch zugeordnet erwiesen hat. Obwohl dieser Screen sich auf Gene konzentrierte, die krankheitsimpliziert sind, wurden diese Klone mituntersucht. Die positiven Ergebnisse, d.h. interessante Expressionsmuster, welche bei acht der nicht zugeordneten Klone (RZPDp609I0626, RZPDp609K1732, RZPDp609N0516, RZPDp609M1026, RZPDp609P1313, RZPDp609G0144, RZPDp609H0631, RZPDp609A2047) auftraten, rechtfertigen im Nachhinein diesen Schritt und unterstreichen die Bedeutung von systematischen, nicht durch Vorauswahl eingeschränkten in-situ Screens von cDNA-Banken (A. Musa, persönliche Mitteilung).

### **4.3 Bedeutung für die biomedizinische Forschung**

Die Erforschung von Genexpression in ihrer räumlichen und zeitlichen Dimension bildet eine Grundlage für die weitergehende Erforschung der molekularen Ursachen von Krankheiten in verschiedenen Organen. Methodischer Ansatz hierfür ist die Klonierung von cDNA, Erstellung von cDNA Bibliotheken und anschließende in-situ-Hybridisierung gegen einzelne Gewebe, Organe oder Ganzkörperpräparate (whole mount). Das Verständnis physiologischer Aktivität von Genen lässt nach Vergleich mit der geänderten Expression in pathologisch veränderten Geweben Rückschlüsse ziehen auf die zugrundeliegende Störung.

Diese Arbeit stellt einen Ausgangspunkt dar für die funktionelle Analyse einer grossen Anzahl von erblich bedingten Krankheiten des Menschen, für die ein homologes Gen im Zebrafisch identifiziert wurde. Die hier gezeigte Musterbildung gibt einen ersten Eindruck vom Expressionsverhalten der Krankheitsgene im Zebrafisch. Dies erlaubt es, sich in der grossen Anzahl von Klonen der zugrundeliegenden cDNA Bibliothek als erstes auf diejenigen zu konzentrieren, welche nur differentiell in bestimmten Organsystemen und / oder zu bestimmten Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung exprimiert werden. Weiterführende Schritte in der funktionellen Analyse dieser Gene können dann die Überexpression oder der funktionelle knock-out sein.

Die Konzentration auf Gene, welche in irgendeiner Form als involviert in Krankheiten angesehen werden, verleiht diesem Ansatz zusätzliche Legitimation. Da die zugrundeliegenden Gene für die Auslösung von Erbkrankheiten oft nur unzureichend funktionell charakterisiert worden sind, ist es notwendig, ihre physiologische Funktion im Organismus (anhand der funktionellen Analyse in Modellorganismen) zu kennen.

Die Suche nach Homologien in anderen Organismen ist demzufolge ein experimenteller Ansatz, um indirekt Erkenntnisse für medizinische Fragestellungen zu erlangen. Oftmals basieren die Erkenntnisse bezüglich des betroffenen Gens lediglich auf einer klinischen Fallbeschreibung, welche von einem bestimmten Syndrom im Zusammenhang mit diesem Gen berichtet.

Eine weitere Schwierigkeit liegt darin, dass Erkenntnisse zu bestimmten Genregulationsvorgängen zwar ein erster Schritt zum Verständnis der Pathogenese sein können, jedoch für sich allein kaum eine völlige Erklärung der Krankheit liefern. Gene wirken gewöhnlich in einem Netzwerk, in dem sie sich untereinander beeinflussen und regulieren. Diese Mechanismen spielen sich teilweise auch erst nach der Transkription auf Proteinebene ab.

#### **4.4 Korrelation zwischen Expressionsmuster und Krankheit**

Der Begriff einer "revolutionären Entwicklung" in unserem Verständnis von Krankheitsentstehung ist nicht zu hoch gegriffen, da in der Molekularbiologie Methoden zur Verfügung stehen, die es uns erlauben, ursprünglich als sehr unterschiedlich klassifizierte Krankheiten auf gemeinsame Prinzipien zurückzuführen. Dazu ist es notwendig, den

funktionellen Zustand einer Zelle auf unterschiedlichen Ebenen (Gen/ Protein) zu kennen, um durch Vergleich mit pathogenetisch wirkenden Abweichungen innerhalb des Netzwerkes interagierender Moleküle Rückschlüsse auf deren Ursache ziehen zu können.

#### **4.4.1 Klon RZPDp609A0329**

Der Klon RZPDp609A0329 weist im Zebrafisch ein auf den Pronephrogang begrenztes Expressionsmuster auf. Die menschliche Krankheit, welche mit diesem Gen in Verbindung gebracht wird, ist pathophysiologisch auf einen Defekt eines glucosetransportierenden Proteins zurückzuführen. Primär scheinen Transportvorgänge auf der Ebene der Blut-Hirnschranke und der Glucoseaufnahme in die Erythrocyten betroffen zu sein. Die Glucoseaufnahme beider Organe ist essentiell, da das Gehirn sehr sensibel auf unzureichende Glucosezufuhr reagiert und die Erythrocyten völlig abhängig von ihr sind, da sie keine anderen Mechanismen zur Energiegewinnung besitzen. Das Krankheitsbild bei Mutation im *SCL2A1* Gen ist durch Wachstums- und Entwicklungsstörung, Microencephalie und hypoglykämische Krisen gekennzeichnet. Im Gehirn kündigt sich eine Hypoglykämie durch nervöse Ausfallerscheinungen an und kann sich bei Persistenz der Stoffwechsellage zu einem hypoglykämischen Schock mit letalem Ausgang weiterentwickeln.

Der hier verwendete Klon besitzt eine 77% Homologie mit *SCL2A1* (Synonym *GLUT1* in der Maus). Für das Glucose-Transportprotein sind fünf Subtypen beschrieben (Shepherd and Kahn 1999), deren Defekte unterschiedliche Organe betreffen, je nachdem, in welchem Organ der entsprechende Subtyp vorherrscht. Der hier genannte Subtyp *SCL2A2* scheint als Transportprotein an der Glucoseaufnahme in der Niere beteiligt zu sein.

Da die Glucoseaufnahme und deren aerobe Verwertung für die Synthese von ATP ein Grundprinzip in jeder Zelle darstellt, haben Störungen der beteiligten Mechanismen oftmals gravierende Auswirkungen für die erkrankten Personen (*Diabetes mellitus*).

Die im Zebrafisch gezeigte Aktivität des Gens im Pronephrogang deutet darauf hin, dass dort ein Glucosetransportprotein gebildet wird, welches die Rückresorption von Glucose aus dem Primärharn steuert, ein Mechanismus, der auch im Menschen bekannt ist. Bei Störung dieses Transportproteins würde der Körper Glucose verlieren und damit ebenfalls in den

Zustand der Hypoglykämie ableiten. Im Menschen ist dies bei Nierenschäden eine relativ häufige Komplikation.

#### **4.4.2 Klon RZPDp609P0227**

Eine 80% Homologie mit dem Gen *ELAV2* (Synonym *HUB*) zeigte der Klon RZPDp609P0227 in der BLAST-Suche. Dieses Gen wird als ein evolutionär konserviertes spezifisches RNA Bindungsprotein beschrieben, welches spezifisch ist für Gehirn- und anderes Neuralgewebe. Im klonierten Gen des Menschen steht *ELAV2* für "embryonic lethal abnormal vision-like 2". In *Drosophila* ist eine Mutation im entsprechenden Homolog phänotypisch durch multiple Defekte im ZNS als auch durch dessen Hypotrophie gekennzeichnet. In der Maus ist das Homolog als *HUB* bekannt. Es stellt ferner ein Antigen dar, welches ursächlich sein soll bei paraneoplastischen Erkrankungen im Gefolge einer Tumorerkrankung. Tumoren, welche dieses Protein bilden, sind dadurch in der Lage, eine desaströse Autoimmunantwort durch eine Kreuzreaktion mit Neuralgewebe zu induzieren. Das Immunsystem richtet sich somit gegen körpereigene Strukturen und bewirkt eine Degeneration von Neuronen (Fletcher et al. 1997). Es ist ein Beispiel, wie ein Gen sowohl eine physiologische Funktion erfüllen als auch pathologisch im Rahmen eines Tumorgeschehens "entarten" kann.

Das Expressionsmuster ist auf neuronales Gewebe beschränkt. mRNA Synthese konnte für das Ganglion trigeminale, das Vorderhirn und die sogenannten Mauthnerzellen gezeigt werden. Für diesen Klon wurde desweiteren die Sequenz nochmals verifiziert.

Die Implikation dieses Gens in einen komplizierenden Faktor bei Tumorleiden sollte eine weitere Erforschung rechtfertigen, da die Auswirkungen der Paraneoplasie die Lebenserwartung bei betroffenen Patienten rapide sinken lassen. Ein Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen kann hilfreich sein in Hinblick auf mögliche Therapiemassnahmen.

#### 4.4.3 Klon RZPDp609I0626

Dieser Klon stellt eine Ausnahme dar in Hinsicht auf eine wahrscheinlich falsch zugeordnete Sequenz im Rahmen der Sequenzbestimmungen an der Wahington University (siehe 4.1). Da die BLAST Suche nach "Krankheitsgenen" auf Basis der von der Washington University generierten Sequenzen und unserer Verifizierung im Rahmen der nochmaligen Sequenzbestimmungen differierende Ergebnisse erbrachte, ist für diesen Klon eine Homologie zu einem krankheitsinvolvierten Gen nicht bekannt. Trotz Sequenzierung sowohl des 5' als auch des 3' Ende des Plasmids konnte in einer erneuten BLAST-Suche kein Ergebnis erhalten werden. Interessant ist jedoch das Expressionsmuster dieses Klons, welches herzspezifisch und im 18 hpf. sowie im 24 hpf. alten Embryo nachweisbar ist. Obwohl der Focus dieser Arbeit sich auf Gene richtet, die in Krankheitsvorgänge impliziert sind, hat es sich ausgezahlt, auch diejenigen Klone einzuschliessen, welche an der Washington University falsch sequenziert wurden. Aufgrund seines Expressionsmusters kann dieser Klon für die weitere Erforschung von Vorgängen in der Herzentwicklung hilfreich sein. In Embryonen des 18 hpf. und 24 hpf. Stadium kann der Klon als Markergen eingesetzt werden. Aufgrund der Expression in späten Stadien der Embryonalentwicklung mag es sich um ein strukturelles Protein des Herzmuskels handeln.

#### 4.4.4 Klon RZPDp609B2017

Für diesen Klon ist das seltene, an zwei Stellen gleichzeitig auftretende restringierte Expressionsmuster typisch. Die 24 hpf. Embryonen weisen eine Färbung im Schwanzteil (engl. *tailbud*) als auch im Ohrbläschen (engl. *otic vesicle*) auf. Letztgenannte Struktur ist im Menschen das Hauptgleichgewichtsorgan. Im Zebrafisch ist es eine sehr kleine Zellregion, die nur wenige Zellen umfasst und schwer erkennbar ist; zur Verdeutlichung wurde eine Aufnahme in höherer Auflösung angefertigt.

In der BLAST Suche wurde eine 60% Homologie (Identität) mit dem Gen *FNI* (Synonym *FN*) festgestellt. Allerdings ist die analysierte Sequenz mit einer Länge von 53 Nucleotiden sehr kurz. *FNI* ist ein Strukturprotein, welches bei Auftreten eines Ehlers-Danlos-Syndrom mutiert ist. Diesbezüglich würde man ein Auftreten eher in Bindegewebsstrukturen erwarten.

Für die weitere Analyse ist es notwendig, durch erneutes Sequenzieren ein aussagekräftigeres Resultat zu erhalten.

#### **4.4.5 Klon RZPDp609K1732**

Ebenfalls ein völlig unzureichendes Resultat für die Sequenzierung zeichnet diesen Klon aus. Demgegenüber steht eine eindrucksvolle Färbung im Blut. Die Morphologie der Erythrocyten zeigt sich in der körnigen Struktur, welche in der Aorta aufleuchtet. Die Sequenz dieses Klons wurde als einem MHC II-Fragment (engl. *major histocompatibility complex II*) homolog analysiert, aber aufgrund eines Erwartungswertes von 1.0 bei einer Länge von lediglich 5 Nukleotiden, verworfen.

MHC II kommt auf Makrophagen und lymphatohaematopoietischen Zellen vor und spielt bei Abwehrprozessen des Immunsystem eine Rolle. Es ist in der Lage, T-Lymphocyten zu aktivieren und damit massgeblich Vorgänge der zellulären Immunität zu steuern.

Eine Korrelation zwischen seinem Expressionsmuster im Blut sowie dem MHC II Rezeptor, welcher auf haematopoietischen Zellen angetroffen wird, wäre anzunehmen. Dieses Gen ist nicht direkt in Krankheiten involviert, spielt aber indirekt durch Steuerung des Immunsystems eine Rolle. Die erneute Sequenzierung zur Verifizierung dieser Annahme ist noch nicht abgeschlossen.

Im Rahmen dieses Screens wies auch der Klon RZPDp609P0240 ein spezifisches Expressionsmuster im Blut auf. Er zeigt mit 90% Ähnlichkeit (Proteinebene) eine hohe Homologie zu einem Transkriptionsfaktor, welcher wahrscheinlich in das Auftreten von B-Zellymphom (Non Hodgkin Lymphom) involviert ist (Kerckaert et al. 1993).

#### **4.4.6 Klon RZPDp609L0444**

Muskeldystrophien zählen im Menschen zu den häufiger auftretenden Erbkrankheiten. Betroffene Patienten werden nach einer gewissen Zeit durch die progrediente Funktionseinbuße ihrer Muskeln an den Rollstuhl gefesselt und versterben meist an einem

Funktionsausfall des Zwerchfells, welcher die Atmung unmöglich macht. Die geistigen Fähigkeiten bleiben weitgehend unbeeinträchtigt.

Der Klon RZPDp609L0444 besitzt eine 74% Homologie (Identität) mit *MYH3* (engl. *Myosin heavy chain, fast skeletal muscle, embryonic*), welches ursprünglich in Muskeldystrophie involviert sein sollte. Diese Annahme hat sich inzwischen nicht bestätigt (Quelle: GeneCards; bioinformatics.weizmann.ac.il/cards im Oktober 2001). Das Gen wird interessanterweise auch im Menschen in frühen Entwicklungsstadien der Embryonalperiode exprimiert und wirkt in Vorläuferzellen des späteren Muskels. Dies ist auch aus dem Expressionsmuster des Zebrafisch ableitbar, da sich aus den Somiten, in welchen die Färbung spezifisch auftritt, das Muskelgewebe entwickelt. Eine Expression trat nur im 18 hpf. Embryo auf, was darauf hindeutet, dass es sich nur um eine zeitlich begrenzte Expression handelt. Wahrscheinlich ist, dass dieser Klon Mitglied einer Gruppe von Genen ist, welche zur Muskeldifferenzierung notwendig sind.

Auch die Klone RZPDp609C2134 und RZPDp609E1015 besitzen ein auf die Somiten beschränktes Expressionsmuster. Sie sind ebenfalls beide in Muskeldystrophien involviert (Gliedergürtel-Syndrome Typ 2F und 2B).

#### **4.4.7 Klon RZPDp609F2227**

Eine Markergenfunktion für das Rhombencephalon kann man diesem Klon zuschreiben. Expression ist nur im 10 hpf. und 14 hpf. Embryo nachweisbar. *C-Maf*, ein Transkriptionsfaktor, zu welchem der Klon RZPDp609F2227 eine 66% Homologie (Identität) aufweist, wird beim Multiplen Myelom gefunden und spielt dort eine Rolle als Protooncogen. Die Erkrankung ist eine Neoplasie der terminalen B-Lymphocyten (Plasmazellen), die Prognose quoad vitam schwankt zwischen einigen Monaten und Jahren. *C-Maf* scheint durch eine Translokation dysreguliert und verstärkt exprimiert zu werden. Das Multiple Myelom ist der erste beschriebene Tumor, in welchem *C-Maf* als Protooncogen wirkt (Chesi et al.1998).

Im Zebrafisch scheint die Expression im *bud*- und 10-Somitenstadium mit der Differenzierung des Rhombencephalon zusammenzuhängen.

Dies wurde auch bei näherer Analyse der Sequenz festgestellt, die sich als Homolog eines im Zebrafisch als *valentino* bekannten Gens (Cooke et al. 2001) erwies (*Swissprot Accession*

Nummer O73679). In der Maus ist das Gen als *kreisler*, einem Transkriptionsfaktor, bekannt. Das beschriebene Expressionsmuster in den Rhombomeren 5/ 6 des Zebrafischs zeigte sich auch bei diesem Screen. Mutanten des Gens *valentino* im Zebrafisch zeigen Unfähigkeit zur Differenzierung der Rhombomere 4 bis 7.

#### **4.4.8 Klon RZPDp609J0811**

Im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Klon hat sich für den Klon RZPDp609J0811 eine Korrelation zwischen der vermuteten Krankheit und dem Expressionsmuster nicht herleiten lassen. Eine Homologie von 62% (Identität) konnte zu RBP4, einem Retinol bindenden Protein, aufgezeigt werden, welches impliziert ist in Nachtblindheit und andere, auf den relativen Vitamin A Mangel bzw. Transportdefekt zurückzuführende Symptome wie Hyperkeratosis, Bronchitiden, Pyelonephritiden und Lithiasis (Classen et al. 1998). In der OMIM Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) sind wenige Informationen bzgl. der Pathologie verfügbar. Der Großteil bezieht sich auf die Störungen des Sehorgans wegen der für die Patienten drastischen Konsequenzen.

Im Hybridisierungsscreen wies der Klon eine Expression an der Aussenseite des Dottersacks, sowie in der Dottersackverlängerung auf. Eine wiederholte Sequenzierung zur Verifizierung des Klons bestätigte das Ergebnis. Generell würde man eine Expression des betroffenen Gens eher im Plasma (Blut) erwarten aufgrund der physiologischen Funktion des Proteinproduktes, den Transport von Substanzen im Blut sicherzustellen (carrier). Auf der anderen Seite ist der Grad der Homologie (62%) mittelmässig, so dass eine Sequenzanalyse auch vom 3' Ende des Plasmids weitere Erklärungen liefern könnte. Das Expressionsmuster allein sollte Grund für eine genauere Analyse sein.