

5 Summary

The present study approached the identification of molecular pathways involved in the cardiac developmental process by addressing first a high-throughput gene expression analysis in human and secondary the distinct functional characterisation of a new potential key player, namely, DPF3, in model organism.

The gene expression profile showed disease-specific molecular portraits of Tetralogy of Fallot (TOF) and Ventricular Septal Defects (VSD) as well as genes involved in the biomechanical adaptation process due to pressure overload. The combination of statistical analysis and the study design enabled the separation of secondary adaptation-specific expression patterns from effects attributable to primary cardiac dysdevelopment. In addition, a chamber-specific genome-wide expression portrait of the normal human heart could be provided.

To get a global overview of gene expression patterns for the disease and tissue types, we applied a variety of computational tools, such as the class discovery method ISIS and the statistical method of correspondence analysis, which can associate functional gene categories with particular phenotypes. Thus known genes and pathways involved in the developmental process and the molecular difference between the atria and the ventricle could be confirmed. Moreover, a global molecular portrait of the normal and diseased heart using a genome-wide approach including functionally unknown genes was obtained. In the following a selection of those genes was subjected to mouse whole mount *in situ* hybridisations in key stages of cardiogenesis.

The most appealing cardiac expression pattern was obtained for Dpf3, a potential transcription factor, which was therefore selected for further functional analysis. DPF3 belongs to the D4 family, which has been assigned to the nervous system. Three splice forms of DPF3 are known, characterised by a C2H2 type zinc finger and a double PHD domain at the protein level. DPF3/1 and DPF3/2 revealed a significant upregulation in TOF malformations versus normal hearts. During mouse embryogenesis, Dpf3/1 showed expression in the cardiac crescent in E7.5 embryos. Moreover, Dpf3/1 was specifically expressed in the tubular heart, youngest somites and presomitic mesoderm of E8.5 embryos. At E9.5, Dpf3 expression was detected in the looping heart and the somites, as well as the developing brain and liver. From

E10.5 onwards expression of Dpf3/1 in the cardiac region decreased, whereas expression in the developing nervous system and liver was getting more prominent. However, weak cardiac expression persisted throughout all embryonic stages investigated (until E13.5 embryos). For the Dpf3/2 splice variant expression was first detected at E9.5 in the septum transversum giving rise to liver, but no striking cardiac expression was observed during development. Chicken *in situ* hybridisations of Dpf3 displayed expression in the sinoatrial region of the developing heart.

Bioinformatic analysis of the DPF3 promoter exhibited a RAREs/DR1 DNA binding site recognised by retinoic acid receptor (RAR/RXR) heterodimers as well as COUPTF/RXR complexes, which are well known to be key players of the cardiac developmental process.

Thus, to gain a better insight of the DPF3 in the retinoic acid signalling pathway, cultured chicken embryos were subjected to all-*trans*-retinoic acid treatment. Administration of an excess of all-*trans*-retinoic acid resulted in an increased expression in the sinoatrial region of the looping heart and a diminished expression in the neural tube suggesting a tissue specific regulation of DPF3 mediated by retinoic acid receptors and COUPTFs in cardiogenesis.

Taken together the results of microarray analysis using human samples in combination with model organism for distinct functional studies opens a new window to understand cardiac adaptation and development.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Identifizierung von molekularen Signalwegen, die an der Herzentwicklung beteiligt sind. Dazu wurde zunächst im Hochdurchsatz eine Genexpressionsanalyse an humanen Proben durchgeführt und darüber hinaus DPF3, ein neues potentiell Schlüsselprotein in Modellorganismen funktionell charakterisiert.

Die Genexpressionsprofile zeigten krankheitspezifische molekulare Portraits des Morbus Fallot (TOF) und des Ventrikelseptumdefekts (VSD). Ausserdem konnten Gene identifiziert werden, die an der mechanischen Anpassung an eine erhöhte Druckbelastung beteiligt sind. Das gewählte Studiendesign und die entsprechende statistische Analyse ermöglichte die getrennte Betrachtung von Expressionsmustern spezifisch für sekundäre Anpassungsvorgänge und Genprofilen, die aus der primären kardialen Fehlentwicklung resultieren. Des weiteren konnte ein kammerspezifisches genomweites Expressionsportrait von normalen humanen Herzen erstellt werden.

Um einen generellen Überblick über die Genexpressionsmuster für die einzelnen Erkrankung und die Gewebetypen zu bekommen, wurden eine Reihe von bioinformatischen Methoden angewendet, beispielsweise die Klassendifferenzierungsmethode ISIS und die statistische Korrespondenzanalyse, wodurch funktionelle Genkategorien mit bestimmten Phänotypen assoziieren werden konnten. So wurden für Entwicklungsprozesse bedeutsame bekannte Gene und Signalwege sowie für die molekularen Unterschiede zwischen Atrium und Ventrikel verantwortliche Gene bestätigt. Darüber hinaus ergab sich durch den genomweiten Ansatz ein globales molekulares Portrait von normalen und fehlgebildeten Herzen, das auch funktionell unbekannte Gene enthält. Daraus wurden bisher uncharakterisierte Gene ausgewählt und im folgenden *in situ* Hybridisierungen an Mausembryonen in Schlüsselstadien der Herzentwicklung durchgeführt.

Das auffälligste Herz-Expressionsmuster zeigte der potentielle Transkriptionsfaktor Dpf3, der daher weiter funktionell charakterisiert wurde. DPF3 gehört zur D4 Familie, deren Bedeutung bisher nur im Nervensystem bekannt ist. Es sind drei Spleißvarianten von DPF3 bekannt, die sich auf Proteinebene durch einen C2H2 Zinkfinger und eine doppelte PHD-Domäne auszeichnen. Die Spleißformen DPF3/1

und DPF3/2 waren in TOF fehlgebildeten Herzen signifikant stärker exprimiert als in normalen Herzproben. Während der Herzentwicklung der Maus wurde in E7.5 Embryonen eine starke Expression von Dpf3/1 im halbmondförmigen Herzfeld nachgewiesen. Darüber hinaus war Dpf3/1 in E8.5 Embryonen besonders im tubulären Herz, den jüngsten Somiten und dem präsomitischen Mesoderm exprimiert. Im Stadium E9.5, konnte Dpf3 Expression in der Herzschleife und in den Somiten, sowie im sich entwickelnden Gehirn und Leber detektiert werden. Vom Stadium E10.5 an nahm die Expression von Dpf3/1 in den kardialen Regionen ab, während sich eine verstärkte Expression im sich entwickelnden Nervensystem und der Leber zeigte. Dennoch blieb eine schwache Herzexpression während allen betrachteten Embryonalstadien (bis E13.5) erhalten. Für die Dpf3/2 Spleißvariante wurde im E9.5 Stadium erstmals Expression nachgewiesen und zwar im Septum Transversum, aus dem sich später die Leber entwickelt. Dagegen zeigte sich keine deutliche Expression im Herzen während der Entwicklung. In Huhn *in-situ* Hybridisierungen konnte die Expression von Dpf3 in der sinoatrialen Region des sich entwickelnden Herzens detektiert werden.

Die bioinformatische Analyse des DPF3-Promoters zeigte eine RAREs/DR1 DNA-Bindungsstelle, die von Retinsäure-Rezeptor Heterodimeren (RAR/RXR) und COUPTF/RXR Komplexen erkannt wird. All diese sind als Schlüsselmoleküle im Herzentwicklungsprozess bekannt.

Um die potentielle Bedeutung von DPF3 in der Retinsäure-Signalkaskade zu untersuchen wurden Huhnembryonen mit *all-trans*-Retinsäure behandelt. Die Administration eines Überschusses an *all-trans*-Retinsäure resultierte in einer erhöhten Expression von Dpf3 in der sinoatrialen Region der Herzschleife und einer verminderten Expression im Neuralrohr. Dies lässt eine durch Retinsäure und COUPTFs beeinflusste gewebespezifische Regulation von DPF3 bei der Herzentwicklung vermuten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier gezeigte Kombination von humanen Microarray-Ergebnissen mit funktionellen Studien an Modellorganismen neue Möglichkeiten für die Untersuchung von Herzentwicklung und kardialen Anpassungsvorgängen liefert.