

5 Summary

Dpf3 is a member of the d4 protein family expressed in striated muscle and neuronal cells during embryonic development, with an onset of expression during early stages of cardiogenesis. Gene expression profiling of humans with a congenital heart defect, namely Tetralogy of Fallot, had shown increased levels of *DPF3* transcripts in these patients. The functional and biochemical role of Dpf3 was previously uncharacterized, but the presence of a C2H2-zinc-finger as well as a tandem plant-homeodomain (PHD) in Dpf3 proteins suggested that it might play a role in regulation of gene expression. These findings led to the hypothesis that Dpf3 plays a role in regulating the genetic programme guiding heart development, which was tested in a combined approach of developmental and biochemical studies. The role of Dpf3 during embryonic development was analyzed in zebrafish embryos. Full-length zebrafish *dpf3* was cloned and characterized regarding its expression pattern during embryogenesis. As in higher vertebrates, it was expressed in striated muscle and neuronal cells. Knockdown of *dpf3* by morpholino-modified antisense oligonucleotides revealed an essential role for *dpf3* in heart and skeletal muscle development. Using microarray detection combined with quantitative real-time PCR, it could be shown that many genes essential for formation of the sarcomeric z-disc as well as myogenic transcription factors were deregulated in *dpf3* morphants. Protein interaction partners of Dpf3 were identified, which led to the finding that Dpf3 is a novel component of the BAF chromatin remodeling complex. The molecular function of Dpf3 was analyzed by testing the hypothesis that the plant-homeodomains of Dpf3 interact with histone tails, a feature previously shown for other PHD fingers. The PHD fingers of Dpf3 have been shown to recognize methylated lysine 4 on histone 3. In addition to the well-established methyllysine recognition, additional specific interactions were found with acetylated lysine residues on histones 3 and 4, a previously unknown property of the PHD finger. In line with these data, chromatin immunoprecipitation showed that Dpf3 target genes play a role in chromatin remodeling as well as heart development, supporting the data obtained in zebrafish embryos. The transcriptional regulation of the *DPF3* gene was analyzed, resulting in the delineation of regulatory elements which are targets of cardiogenic transcription factors. Members of the d4 protein family could be traced back to the roundworm *C. elegans*, while the C2H2-zinc and PHD-fingers are already present in yeast proteins, which play a role in chromatin remodeling. In summary, this study has shown that Dpf3 is a novel

component of the BAF chromatin remodeling complex that recognizes distinct histone modifications and is essential for heart and skeletal muscle development.

6 Zusammenfassung

Dpf3 gehört der d4-Proteinfamilie an und ist während der Embryonalentwicklung in der gestreiften Muskulatur sowie in Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert. Die früheste Expression wurde dabei in den ersten Stadien der Herzentwicklung beobachtet. Darüber hinaus hatten Genexpressionsstudien von Menschen mit dem angeborenen Herzfehler Fallot'sche Tetralogie eine Überaktivität des *DPF3* Gens gezeigt. Die funktionellen und biochemischen Eigenschaften von Dpf3 waren bisher unbekannt, jedoch deutete das Vorhandensein eines C2H2-Zink-Fingers sowie einer doppelten Plant-Homeodomäne daraufhin, dass Dpf3 eine Rolle in der Regulation der Transkription spielt. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass Dpf3 an der transkriptionellen Regulation von herzentwicklungsrelevanten Genen beteiligt ist, welche in einer Kombination aus entwicklungsbiologischen und biochemischen Studien analysiert wurde. Die Rolle von Dpf3 während der Embryonalentwicklung wurde im Zebrafisch untersucht. Expressionsstudien zeigten, dass *dpf3* in einer evolutionär konservierten Weise in gestreifter Muskulatur sowie in Zellen des Nervensystems exprimiert ist. Die essentielle Rolle von *dpf3* für die Herz- und Skelettmuskelentwicklung des Zebrafisches wurde durch Verwendung von morpholino-modifizierten antisense-Oligonukleotiden gegen *dpf3* gezeigt. Die Ursache der Herz- und Skelettmuskeldefekte war in einer fehlerhaften Anordnung der Myofibrillen sowie einzelner Sarkomere begründet. Insbesondere waren Proteine der z-Linie der Sarkomere sowie muskelspezifische Transkriptionsfaktoren betroffen, was durch Microarray-Studien und quantitative Real-time PCR gezeigt wurde. Die Analyse von Dpf3 Protein-Interaktionspartnern führte zu dem Erkenntnis, dass Dpf3 eine neue Untereinheit des BAF Chromatin Remodeling Komplexes ist. Basierend auf der Hypothese, dass die Plant-Homeodomäne mit Histon-Schwänzen interagieren kann, wurde die molekulare Funktion von DPF3 getestet. Diese Experimente zeigten, dass zusätzlich zu der für die Plant-Homeodomäne bekannten Interaktion mit methyliertem Lysin 4 auf Histon 3 auch Interaktionen mit acetylierten Lysinen auf Histon 3 und 4 möglich waren. Darüber hinaus wies eine Analyse von Dpf3 Zielgenen mittels Chromatin-Immunpräzipitation darauf hin, dass Dpf3 eine Rolle in der epigenetischen Regulation von herzentwicklungsrelevanten Genen spielt. Die transkriptionelle Regulation des *DPF3* Gens wurde analysiert, was zur Identifikation von regulatorischen Promotor-Elementen führte, welche Ziel von kardiogenen Transkriptionsfaktoren sind. Eine evolutionär

vergleichende Sequenzanalyse führte zur Erkenntnis, dass die d4-Familie im Fadenwurm *C. elegans* ihren Ursprung hatte, wohingegen die C2H2- und PHD-Zink-Finger bereits in Proteinen der Hefe *S. cerevisiae* zu finden sind und auch dort an Prozessen der transkriptionellen Regulation beteiligt sind. Zusammenfassend hat diese Studie gezeigt, dass Dpf3 eine neue Komponente des BAF Chromatin Remodeling Komplexes ist, diverse Histon-Modifikationen erkennt und essentiell für die Herz- und Skelettmuskelentwicklung ist.