

# Analyse des Phänotyps Myf-5 mutanter Mäuse nach konditioneller Geninaktivierung

# Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor Rerum Naturalium (Dr. rer. nat.)



vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Axel Kaul Geb. am 22. November 1968 in Braunschweig

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Braun Prof. Dr. Harald Jockusch Prof. Dr. Christoph Viebahn

Promotionsgesuch eingereicht am 12. März 2003 Tag der öffentlichen Verteidigung: 17. Juli 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005269 [http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005269]



Abb. 1: Die wichtigsten Mitarbeiter dieser Arbeit.

Diese Arbeit ist meiner Mutter Heide Kaul gewidmet, die immer an mich glaubt und immer für mich da ist.

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	INHAL	TSVERZEICHNIS	3
2	ZUSA	MMENFASSUNG	7
2.2	Abst	tract	9
2.	.2.1	A new Myf-5 allele leads to complete loss of early myotome formation, but shows no effect on rib development	9
3	ABKÜ	RZUNGEN UND FACHAUSDRÜCKE	11
4	EINLE	ITUNG	13
4.1	Die	Familie der MRF-Transkriptionsfaktoren	13
4.2	Der	Ablauf der Myogenese	15
4.3	Die	Eigenschaften des myogenen Transkriptionsfaktors Myf5	18
4. 4.	.3.1 .3.2	Skelettmuskelentwicklung der Maus Die Rolle von Myf5 im Zellzyklus	18
4.4	Skel	ettmuskelentwicklung in MRF mutanten Mauslinien	20
4.5	Ripp	benblasteminduktion in Myf5-defizienten Mäusen	.23
4.6	Мус	otuben und Satellitenentwicklung	25
4.7	Elek	trophysiologie der Skelettmuskulatur	.27
4.8	Einf	ührung in die Cre/loxP-Rekombinationstechnologie	.27
4.9	Das	Ziel der vorliegenden Arbeit	28
5	MATE	RIAL UND METHODEN	30
5.1	Mat	erial	30
5.	.1.1	Chemikalien	30
5.	.1.2	Radiochemikalien	30
5.	.1.3	Spezifische Reagenzien	30
5.	.1.4	Lösungen	31
5.	.1.5	Antıkörper	.32
5.	.1.6	Bakterienstamm	. 32
). 5	.1./		32
5. 5	19	Mauslinien	32
5.	.1.10	Viren	35

5.1.11	Zellkulturlinien	
5.1.12	Vektoren	
5.1.13	Vektoren zur Erstellung von Riboproben	
		20
5.2 Met	hoden	
5.2.1	Standardbedingungen und Methoden der Molekularbiologie	
5.2.2	Extraktion von genomischer DNS aus Mausschwanzspitzen	
5.2.3	Gewinnung von genomischer DNS aus Organen	
5.2.4	Elution von DNS aus Agaroseblöcken	
5.2.4.1	Elektroelution	
5.2.4.2	DNS Extraktion mittels DNS-Extraktionkit	
5.2.5	Die Klonierung des Myf5 <sup>- of an</sup> Allels	
5.2.6	ES-Zellkultur	
5.2.6.1	Elektroporation und Selektion von ES-Zellen	
5.2.7	Generierung Transgener Mäuse	
5.2.8	Genotypisierung	
5.2.8.1	Genotypisierung auf mdx und Dystrophin	
5.2.9	Adenovirenpräparation	
5.2.9.1	Injektion von Adenoviren	
5.2.10	Elektronenmikroskopische Untersuchung	
5.2.10.1	Gewinnung und Einbettung der Gewebeproben	44
5.2.10.2	Bestimmung von Satellitenzellen am Elektronenmikroskop	45
5.2.11	Dekalzifizierung von knochenhaltigen Geweben	45
5.2.12	Histochemie	45
5.2.12.1	Einbettung mit dem Ziel von Kryotomdünnschnitten	45
5.2.12.2	Z/AP-Färbung	
5.2.12.3	Färbung von Bindegewebe nach Weigert/van Gieson	
5.2.12.4	Trichromefärbung	47
5.2.12.5	Anfärbung von Knorpelsubstanzen	47
5.2.12.6	Immunhistochemische Anfärbungen	
5.2.12.7	Whole mount Immunhistochemie	
5.2.13	Whole Mount in situ Hybridisierung	
5.2.14	In vivo Induktion des Mx-Promotors	
5.2.15	Muskelregenerationsassay	50
6 ERGE	BNISSE	51
6.1 Die	Funktion des Myf5 Gens in der Maus	
6.1.1	Die Klonierung des Myf5-Zielvektors	51
6.1.2	Die konditionale Inaktivierung des Myf5 Gens	53
6.1.2.1	Rekombination des Myf5 <sup>10XP</sup> Allels mittels Mx-Promotor	53
6.1.2.2	Die gewebsspezifische Exzision mittels MCK-Cre Mauslinie	56
6.1.2.3	Das Expressionsmusters des MCK-Promotors	
6.1.2.4	Die vom Z/AP-Allel vermittelte Reportergenexpression	57
6.1.2.5	Die Rekombination in Z/AP-Reportermäusen durch MCK-Cre	59
6.1.2.6	MCK-Cre-Allel vermittelte Rekombination des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus	59
6.1.2.7	Der Einfluß von MyoD auf die MCK-Cre-vermittelte Exzision	61
6.1.2.8	Die Exzision des Myf5 <sup>10xP</sup> Allels mittels Adv5-Cre	64
6.1.3	Die Exzision des Myf5 <sup>10xP</sup> -Allels durch die Cre-deleter-Mauslinie	
6.1.3.1	Der Einfluß von MRF-Nullallelen auf die Rippenformation	66

6.1	3.2 In Myf5 <sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Mäusen werden keine Myf5-Transkripte gebildet	69
6.1	3.3 Die Expression von Muskelmarkern in Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP Mäusen</sup>	71
6.1	4 Die Skelettmuskulatur in MyoD <sup>-/-</sup> :Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP</sup> Embryonen	75
6.1	5 Der klinische Phänotyp adulter $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ Mäuse	
6.1	5.1 Die auffällige Bewegungsweise adulter Myf5 <sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Mäuse	
6.1	5.2 Der Habitus von adulten Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxPTieren</sup>	
6.1	5.3 Der Schwanz von Myf5 <sup><math>\Delta</math>lox<sup>P</sup>/<math>\Delta</math>lox<sup>P</sup>Mäusen</sup>	
6.1	6 Die Muskulatur adulter Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP</sup> Mäuse	
6.1	7 Die Anzahl von Satellitenzellen in adulten Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxPMäusen</sup>	
6.1	8 Einfluß verschiedener Myf5 Genotypen auf die Muskelgeneration	
6.1	9 Die Regeneration in Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP:Mdx<sup>-/o</sup>Mäusen</sup>	
6.1	9.1 Der Muskeldystrophie-Phänotyp	
6.1	9.2 Der Mdx Phänotyp in Myf5 <sup><math>\Delta lox P/\Delta lox P:Mdx-/oMäusen</math></sup>	
6.1	10 Die Elektrophysiologie von Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxPMäusen</sup>	90
6.2	Der Einfluß verschiedener MRF-Genotypen auf die Skelettmuskulatur	
6.3	Kein Rippenphänotyp bei Myf5 <sup>-/-</sup> Mäusen durch frühe somitomale FGF6-	Expression
( )		
6.3	I Die Generierung und Etablierung der Myt5 <sup>r of on</sup> Mauslinie	
6.3	2 Die Myf5 <sup>a</sup> and a Maus weist einen normalen Brustkorb auf	
7 [	ISKUSSION	98
7.1	Überblick	
7.1	Überblick	
7.1 7.2	Überblick Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus	
7.1 7.2 7.2 7.2	Überblick Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels	
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2	Überblick Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels Die Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Allels in der Mx-Cre-Mauslinie	
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2	Überblick Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels Die Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Allels in der Mx-Cre-Mauslinie Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> Allels	98 
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2	Überblick Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1 Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1.1 Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels 1.2 Die Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Allels in der Mx-Cre-Mauslinie 1.3 Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> Allels 1.4 Adenovirus vermittelte Rekombination	98 
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2	Überblick Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1 Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1.1 Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels 1.2 Die Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Allels in der Mx-Cre-Mauslinie 1.3 Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> Allels 1.4 Adenovirus vermittelte Rekombination	98 98 98 98 99 99 
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3	Überblick Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels Die Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Allels in der Mx-Cre-Mauslinie Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> Allels Adenovirus vermittelte Rekombination Myf5 <sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Tiere sind Myf5- <i>Knock-out</i> -Mäuse	98 
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3 7.4	Überblick Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1 Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1.1 Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels 1.2 Die Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Allels in der Mx-Cre-Mauslinie 1.3 Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> Allels 1.4 Adenovirus vermittelte Rekombination Myf5 <sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Tiere sind Myf5- <i>Knock-out</i> -Mäuse Analyse Myf5 defizienter Mäuse	98 98 98 98 99 99 99 100 101 101 101
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3 7.4 7.4	Überblick Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1 Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1.1 Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels 1.2 Die Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Allels in der Mx-Cre-Mauslinie 1.3 Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> Allels 1.4 Adenovirus vermittelte Rekombination Myf5 <sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Tiere sind Myf5- <i>Knock-out</i> -Mäuse Analyse Myf5 defizienter Mäuse	98 98 98 98 98 99 
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4	Überblick Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1 Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1.1 Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels 1.2 Die Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Allels in der Mx-Cre-Mauslinie 1.3 Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> Allels 1.4 Adenovirus vermittelte Rekombination Myf5 <sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Tiere sind Myf5- <i>Knock-out</i> -Mäuse 1 Mögliche Ursachen für Rippenphänotypen in MRF-Mutanten 1.1 Der Einfluß der PGK-Neo-Selektionskassette in <i>cis</i> - und <i>trans</i>	98 98 98 98 99 99 99 100 101 101 101 102 102 103
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4	Überblick Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1 Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1.1 Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels 1.2 Die Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Allels in der Mx-Cre-Mauslinie 1.3 Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> Allels 1.4 Adenovirus vermittelte Rekombination Myf5 <sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Tiere sind Myf5- <i>Knock-out</i> -Mäuse 1.4 Mögliche Ursachen für Rippenphänotypen in MRF-Mutanten 1.1 Der Einfluß der PGK-Neo-Selektionskassette in <i>cis</i> - und <i>trans</i> 1.2 Der Einfluß PGK-Neo-Kassette auf die Chromatinstruktur	98 98 98 98 99 99 99 100 101 101 101 102 102 103 104
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4	Überblick Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1 Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus 1.1 Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels 1.2 Die Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Allels in der Mx-Cre-Mauslinie 1.3 Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> Allels 1.4 Adenovirus vermittelte Rekombination 1.4 Adenovirus vermittelte Rekombination 1.4 Myf5 <sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Tiere sind Myf5- <i>Knock-out</i> -Mäuse 1.5 Mögliche Ursachen für Rippenphänotypen in MRF-Mutanten 1.6 Der Einfluß der PGK-Neo-Selektionskassette in <i>cis-</i> und <i>trans</i> 1.2 Der Einfluß PGK-Neo-Kassette auf die Chromatinstruktur 1.3 Die räumliche Veränderung des MRF4/Myf5-Lokus	98 98 98 98 99 99 99 100 101 101 101 102 102 103 104 105
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4	<ul> <li>Überblick</li> <li>Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus</li> <li>1 Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus</li> <li>1 Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels</li> <li>12 Die Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Allels in der Mx-Cre-Mauslinie</li> <li>13 Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Allels</li> <li>14 Adenovirus vermittelte Rekombination</li> <li>Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Tiere sind Myf5-<i>Knock-out</i>-Mäuse</li> <li>Analyse Myf5 defizienter Mäuse</li> <li>1 Der Einfluß der PGK-Neo-Selektionskassette in <i>cis-</i> und <i>trans</i></li> <li>12 Die Fäumliche Veränderung des MRF4/Myf5-Lokus</li> </ul>	98 98 98 98 99 99 99 100 101 101 101 102 102 103 104 105 106
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4	<ul> <li>Überblick</li> <li>Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus</li> <li>1 Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus</li> <li>1.1 Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels</li> <li>1.2 Die Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Allels in der Mx-Cre-Mauslinie</li> <li>1.3 Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Allels</li> <li>1.4 Adenovirus vermittelte Rekombination</li> <li>Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Tiere sind Myf5-<i>Knock-out</i>-Mäuse</li> <li>1 Mögliche Ursachen für Rippenphänotypen in MRF-Mutanten.</li> <li>1.1 Der Einfluß der PGK-Neo-Selektionskassette in <i>cis</i>- und <i>trans</i></li> <li>1.2 Die räumliche Veränderung des MRF4/Myf5-Lokus</li> <li>1.4 Der Einfluß von Interkostalmuskulatur auf den Brustkorb</li> <li>1.5 Interaktionen zwischen Myf5 und MRF4.</li> </ul>	98 98 98 99 99 99 99 100 101 101 101 102 102 103 104 105 106 106
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4	<ul> <li>Überblick</li> <li>Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus</li> <li>Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus</li> <li>Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels</li> <li>Die Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Allels in der Mx-Cre-Mauslinie</li> <li>Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Allels</li> <li>1.4 Adenovirus vermittelte Rekombination</li> <li>Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Tiere sind Myf5-<i>Knock-out</i>-Mäuse</li> <li>Analyse Myf5 defizienter Mäuse</li> <li>Mögliche Ursachen für Rippenphänotypen in MRF-Mutanten</li> <li>Der Einfluß der PGK-Neo-Selektionskassette in <i>cis</i>- und <i>trans</i></li> <li>Die räumliche Veränderung des MRF4/Myf5-Lokus</li> <li>Jer Einfluß von Interkostalmuskulatur auf den Brustkorb</li> <li>Interaktionen zwischen Myf5 und MRF4.</li> <li>Der Einfluß myotomal sezernierter Faktoren auf das Rippenblastem</li> </ul>	98 98 98 98 99 99 99 100 101 101 101 102 102 102 102 103 104 104 105 106 106 107
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4	ÜberblickDie Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus1Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus1.1Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels1.2Die Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Allels in der Mx-Cre-Mauslinie1.3Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> Allels1.4Adenovirus vermittelte RekombinationMyf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP1.4Adenovirus vermittelte RekombinationMyf5<sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP1.5Der Einfluß der PGK-Neo-Selektionskassette in <i>cis-</i> und <i>trans</i>1.6Der Einfluß von Interkostalmuskulatur auf den Brustkorb1.7Die Finfluß von Interkostalmuskulatur auf den Brustkorb1.8Interaktionen zwischen Myf5 und MRF41.9Der Einfluß myotomal sezernierter Faktoren auf das Rippenblastem2Der Brustkorb von Myf5<sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP2Der Brustkorb von Myf5<sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP</sup></sup></sup></sup>	98 98 98 98 99 99 99 100 101 101 101 102 102 103 104 105 106 106 107 108
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4	ÜberblickDie Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus1Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Lokus1.1Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels1.2Die Exzision des Myf5 <sup>loxP</sup> Allels in der Mx-Cre-Mauslinie1.3Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5 <sup>loxP/LoxP</sup> Allels1.4Adenovirus vermittelte RekombinationMyf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP1.4Adenovirus vermittelte RekombinationMyf5<sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP1.5Der Einfluß der PGK-Neo-Selektionskassette in <i>cis-</i> und <i>trans</i>1.6Der Einfluß von Interkostalmuskulatur auf den Brustkorb1.7Der Einfluß von Interkostalmuskulatur auf den Brustkorb1.8Interaktionen zwischen Myf5 und MRF41.9Der Einfluß myotomal sezernierter Faktoren auf das Rippenblastem2Der Brustkorb von Myf5<sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP3Ursachen für den vormals beobachteten Rippenphänotyp Myf5-defizienter</sup></sup></sup>	98 98 98 99 99 99 99 100 101 101 101 102 102 103 104 105 106 106 106 107 108 zienter
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4	<ul> <li>Überblick</li> <li>Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus</li></ul>	98 98 98 98 99 99 99 100 101 101 101 102 102 103 104 104 105 106 106 106 107 108 zienter 111
7.1 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.2 7.3 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4 7.4	<ul> <li>Überblick</li> <li>Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus</li> <li>1 Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus</li> <li>1.1 Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels</li> <li>1.2 Die Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Allels in der Mx-Cre-Mauslinie</li> <li>1.3 Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Allels</li> <li>1.4 Adenovirus vermittelte Rekombination</li> <li>Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Tiere sind Myf5-<i>Knock-out</i>-Mäuse</li> <li>Analyse Myf5 defizienter Mäuse</li> <li>1 Mögliche Ursachen für Rippenphänotypen in MRF-Mutanten</li> <li>1.1 Der Einfluß der PGK-Neo-Selektionskassette in <i>cis</i>- und <i>trans</i></li> <li>1.2 Die räumliche Veränderung des MRF4/Myf5-Lokus</li> <li>1.4 Der Einfluß von Interkostalmuskulatur auf den Brustkorb</li> <li>1.5 Interaktionen zwischen Myf5 und MRF4.</li> <li>1.6 Der Einfluß myotomal sezernierter Faktoren auf das Rippenblastem</li> <li>2 Der Brustkorb von Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen</li> <li>3 Ursachen für den vormals beobachteten Rippenphänotyp Myf5-defix</li> <li>Mäuse</li> <li>4 Auffälligkeiten im Skelett von adulten Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen</li> </ul>	98 98 98 99 99 99 99 99 99 100 101 101 102 102 102 103 104 105 106 106 106 107 108 zienter 111 112

7.5	Die Skelettmuskulatur adulter Myf5 <sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Mäuse	
7.	5.1 Myotubenentwicklung in Abhängigkeit verschiedener MRFs	
7.	5.2 Der Einfluß der Myf5-Expression auf die Myotubenreparatur	117
7.	5.3 Der Einfluß der Basallamina auf die Muskelregeneration	
7.	5.4 $Mdx^{-/\circ}:Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ Maus als Modell menschlicher Krankheiten	119
7.	5.5 Weitere mögliche Untersuchungen an Myf5-Nullmutanten	
7.6	Zukünftige Perspektiven für konditionale Geninaktivierung	
7.7	Die Analyse der Myf5 <sup>FGF6ki</sup> Mauslinie	
8	TAGUNGSBEITRÄGE UND PUBLIKATIONEN	126
8.1	Tagungsbeiträge	
8.2	Publikation	
9	LEBENSLAUF	127
10	DANKSAGUNG	128
11	LITERATURVERZEICHNIS	130

# 2 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden in mehreren Labors verschiedene Mausstämme mit Nullmutationen des für einen myogenen Transkriptionsfaktor kodierenden Myf5-Gens (Myogenic factor 5) generiert. Die Abwesenheit von Myf-5-Protein im sich entwickelnden Mausembryo führt zu einer Verzögerung der Myotombildung von 1,75 Tagen, bis die myogene Aktivität der einsetzenden MyoD-Expression benötigte Muskelvorläuferzellen determiniert. Die Muskulatur homozygoter Myf5-Mutanten entwickelt sich überraschenderweise normal. Die Abwesenheit des myogenen Myf5-Proteins führt unerwartet zum Fehlen distaler Rippen, in dessen Folge die Mäuse perinatal aufgrund mangelnder Respiration sterben.

Um die Funktion von Myf-5 in adulten Mäusen zu untersuchen, wurde eine Mauslinie generiert, die mit Hilfe der Cre/loxP-Technologie ein konditional inaktivierbares Allel trägt (Myf-5<sup>loxP</sup>). Die kontrollierte Expression der Cre-Rekombinase mit dem Ziel der Inaktivierung des Myf5-Gens (Myf-5<sup> $\Delta$ loxP</sup>) wurde in 4 verschiedenen Ansätzen verfolgt. (1) Zeitliche Kontrolle der Exzision durch den induzierbaren Mx-Promotor. (2) Ausschließlich auf Skelettmuskulatur beschränkte Cre-Rekombinase-Expression durch den muskelspezifischen Muskel-Creatin-Kinase-Promotor. (3) Durch Adenovirus vermittelte Cre-Rekombinase-Expression, um unabhängig von verfügbaren Promotoren und ihren Expressionsprofilen zu sein. (4) Konstitutive Cre-Rekombinase Expression in einer Cre-deleter Mauslinie zwecks frühestmöglicher Myf5-Inaktivierung.

Die Myf5-Exzision im Zygotenstadium sollte eine Phänokopie der alten Myf5-Allele darstellen. Homozygote Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mutanten zeigen unerwartet keine Fehlentwicklung der Rippen. Trotz des völligen Fehlens der frühen Myotomentwicklung sind die Mutanten lebensfähig und fruchtbar, sie weisen keine erhöhte Sterblichkeit auf. Daraus kann geschlossen werden, dass der zuvor für Myf5 mutante Tiere beschriebene Rippenphänotyp durch Missregulation eines noch unbekannten Gens verursacht wird.

Der Schwanz von Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen weist mit einsetzender Adoleszenz auffällige Unterschiede im Vergleich mit dem Wildtyp oder heterozygoten Tieren eines Wurfs auf. Der Schwanz wird im ersten Lebensmonat spannungslos und beinahe immobil, da ihm ein Großteil der knorpeligen Stützelemente fehlt. Dagegen ist die Muskulatur in mutanten Tieren morphologisch nicht auffällig, jedoch weisen alle Myf5-homozygoten Mäuse mit zunehmendem Alter eine buckelige Körperhaltung auf. Die meisten Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mutanten entwickeln zusätzlich motorische Auffälligkeiten im Gang. Diese beiden Phänomene werden häufig im Zusammenhang mit Muskelinsuffizienzen beobachtet.

Eine parallele Strategie die normale Rippenentwicklung in Myf5mutanten Mausembryonen zu gewährleisten, basiert auf der Insertion der für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-6 (FGF6) kodierenden cDNS in den Myf5-Lokus. Das vom Myf5-Promotor exprimierte FGF6 sollte die Induktion des Rippenblastems vermitteln. Homozygote Träger dieser FGF-6-*Knock-in*-Mutation weisen einen unauffälligen Brustkorb bei der Geburt auf, sterben jedoch aus noch ungeklärter Ursache direkt nach der Geburt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue Mauslinien mit Mutationen des Myf5-Lokus analysiert, die nicht zum vormals beschriebenen Rippenphänotyp führen. Die Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mauslinie mit einer 3 Kilobasen großen Exzision im Myf5-Lokus ist lebensfähig. Ein neuer Weg für die eingehendere Untersuchung der Muskelentwicklung und Regeneration in adulten Stadien wurde geöffnet.

#### 2.2 Abstract

# 2.2.1 A new Myf-5 allele leads to complete loss of early myotome formation, but shows no effect on rib development

In recent years different laboratories generated mutations of the gene coding for the transcription factor Myf5 (myogenic factor 5). Insertion of a PGK-neo selection cassette into the coding region destroys the open reading frame. The absence of myogenic regulatory factor Myf-5 leads to a delay of 2.5 days in myotome formation, until the expression of transcription factor MyoD rescues myogenic activity. While the musculature in homozygous Myf5 mutant animals develops normally, they die perinatally due to the absence of the distal portion of ribs leading to respirative failure.

To investigate the role of Myf-5 in adult mice a conditional allele of the Myf5 gene using Cre/loxP technology (Myf5<sup>loxP</sup>) has been generated. Surprisingly, if Myf5 was excised at the zygote stage (now referred to as Myf5<sup> $\Delta$ loxP</sup>), homozygous mice did not show malformations of the ribs. Despite a complete loss of early myotome formation, mutants were viable and fertile and showed no increased mortality. This data leads to the suggestion that the rib phenotype in previously described Myf5-mutant mice is caused by long distance effects on a yet unknown gene. While the musculature of Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sup> mice appears normal, the tail shows striking differences compared to the tail of wildtype or heterozygous littermates. At the age of weaning the tail of homozygous animals displays a lack of tension and becomes nearly immobile. Histological analysis revealed that the number of cartilaginous elements in the tail is severely reduced, while the musculature is unaffected. With increasing age, most Myf5-homozygous mice showed a hunchback-like abnormal posture and most mice developed gait disturbances.

Another approach to rescue the rib phenotype of Myf5-mutant mice is the insertion of a FGF6-cDNA into the Myf5-locus. FGF6 is expected to induce the rib blastema when driven by the Myf5-promoter. Homozygous offspring carrying this FGF6-*Knock-in*-allele showed a normal ribcage but died shortly after birth for a yet unknown reason.

Two new mouse strains were generated carrying mutations in the Myf5-locus. Both mutations exerted no rib phenotype. Only the strain with an excised DNA portion of 3 kb containing the basal promoter and the first exon of Myf5 is viable and fertile. A new path for the examination of myogenesis in embryos and muscle regeneration in adult mice was opened.

# 3 Abkürzungen und Fachausdrücke

Abb.	Abbildung
Adv	Adenovirus
AP	Alkalische Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BmV	Benutzte mikroskopische Vergrößerung
bp	Basenpaar/ -paare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNS	Kodierende DNS, welche aus reverser Transkription einer reifen RNS
Chandraganaga	Knochenhildung mit einhergehander Ogsifizierung von Knochennri
Chondrogenese	mordien.
CMV	Cytomegalovirus
Cpm	(counts per minute) Einheit für die Radioaktivität der verwendeten $\beta$ -
C	Stranler.
Cre	Cre-Rekombinase; bindet und rekombiniert loxP-Sequenzen
$\Delta lox P$	Deletiertes Myf5-Allel durch Exzision der <i>loxP</i> -flankierten DNS
Dıg	Digoxigenin, synthetisches Nukleotid, welches mit einem spezifi- schen AK detektiert werden kann
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
E10 5	Embryonalstadien in Tagen nach Kopulation bzw. Befruchtung
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
FGFR	Rezeptor für Fibroblastenwachstumsfaktoren
Flp	Flp-Rekombinase: bindet und rekombiniert FRT-Sequenzen
FRT	Erkennungssequenz der Flp-Rekombinase
gefloxt	Von loxP-Sequenzen flankierter DNS-Bereich, zwecks Cre-
0	Rekombinase vermittelter Rekombination
h	Stunde
HGF	Hepathozytenwachstumsfaktor
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
In cis	Auf dem gleichen DNS-Strang wie die betrachtete Sequenz liegend
In trans	Durch einen diffusiblen Faktor ein Gen auf einem anderen Chromo-
	som betreffend.
In vitro	In der Zellkultur; außerhalb des Organismus
In vivo	Im lebenden Organismus
Iu	Infektiöse Einheiten des Virustiters
kb	Kilobasenpaare
LacZ	β-Galactosidase
LoxP	Locus of X-ing Over; 34 bp lange Erkennungssequenz der Cre-
	Rekombinase
М	molar
μ	Mikro (1 <sup>-10<sup>-6</sup></sup> )
MCK	Muskel-Kreatin-Kinase

Mdx	Muskeldystrophie
MHC	Myosin-Schwere-Kette
Min	Minuten
Мрс	engl. muscle precursor cells, Muskelvorläuferzellen
MRF	MyoD verwandter Faktor mit myogener Eigenschaft
mRNA/mRNS	Messanger RNS; reife RNS als Matrize der Translation
Myf	Myogener Faktor
MyoD	Namensgebendes Mitglied der MRF-Familie
Myogen	Muskelbildung auslösend
Myostatin	Das Muskelwachstum beschränkender Faktor auch GDF-8 genannt.
Mx	Mx-Promotor; Interferon induzierbarer Promotor
NFAT3	Nuclear Factor of Activated T-cells 3C; Transkriptionsfaktor
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>p.c.</i>	Post coitum = nach Verpaarung, zur Bestimmung der Embryonalsta-
1	dien
PDGFA	Platelet Derived Growth Factor-A: Genprodukt, welches in der De-
	terminierung chondrogener Strukturen involviert ist.
PDGFRa	α-Kette des Rezeptors für PDGFs.
PFA	Paraformaldehyd
Promotor	DNS-Sequenz die der Anlagerung eines Transkriptionskomplexes
	dient
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
S	Sekunde
SF	engl. Scatter Factor siehe auch Synonym HGF
Shh	Sonic Hedgehog, von der Bodenplatte des Neuralrohrs und der Chor-
	da dorsalis sezerniertes Protein, welches MyoD- und Myf5 Expressi-
	on begrenzt
TGF-β	Transforming Growth Factor-β (Wachstumfaktor)
Transkription	Synthese einer RNS-Kopie eines Gens ab dem Promotor
Translation	Umschreibung des Triplettnukleotidkodes einer RNS in eine Amino-
	säureabfolge an den Ribosomen
ü.N.	Über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 4 Einleitung

#### 4.1 Die Familie der MRF-Transkriptionsfaktoren

Zu Beginn der Embryogenese werden Keimblätter angelegt, aus denen sich sukzessive alle vom Organismus benötigten Strukturen ableiten. Die Skelettmuskulatur höherer Vertebraten entwickelt sich aus mehreren Kompartimenten unterschiedlichen entwicklungsgeschichtlichen Ursprungs. Die Kopfmuskulatur entstammt Zellen der Neuralleiste und des Kopfmesoderms (Noden *et al.*, 1983). Im Rumpf entstammen alle Skelettmuskelzellen dem Dermomyotom der Somiten (Christ *et al.*, 1978; Christ and Ordahl, 1995; Brandt-Saberi and Christ, 2000). Das Dermomyotom wird durch induktive Einflüße in einzelne Kompartimente gegliedert, aus denen dann in direkter Nachbarschaft zum Axialskelett, die Skelettmuskulatur und Bestandteile der Dermis hervorgehen (Chevalier *et al.*, 1977; Christ *et al.*, 1992; Denetclaw *et al.*, 2000). Die Skelettstrukturen der Extremitäten gehen nicht aus den Somiten hervor, sondern aus dem lateralen Mesoderm.

In die Regulation von Determinierung und Differenzierung während der Myogenese sind die Mitglieder der MyoD-Related-Factors-Familie (MRF-Familie) involviert. Die 4 MRF-Familienmitglieder MyoD, Myf5, Myogenin und Myf6/MRF4/Herculin (Davis et al., 1987; Braun et al., 1989a; Braun et al., 1989b; Edmondson and Olson, 1989; Miner and Wold, 1990; Rhodes and Konieczny, 1989; Wright et al., 1989) sind Transkriptionsfaktoren, die sich in der die Transkription aktivierenden Domäne sehr unterscheiden (Olson, 1991; Weitraub et al., 1991). Die MRFs weisen ein basisches Helix-Loop-Helix-Motiv (bHLH) auf, welches der Heterodimerisierung mit ubiquitär exprimierten E-Proteinen dient (Abb. 2). Anschließend binden diese Dimere ein E-Box genanntes DNS-Motiv mit der Konsensussequenz CANNTG, welches in Enhancer- und Promotorelementen einiger muskelspezifischer Gene anzutreffen ist. Die Bindung an die DNS und die Erkennung des E-Box-Motivs erfolgt über die basische Domäne des bHLH-Motivs. Durch eine Transaktivierungsdomäne vermitteln diese Faktoren ihren stimulierenden Einfluß auf die Transkription. Die MRF-Faktoren können in vitro in verschiedenen nicht myogenen Zellinien die Myogenese induzieren (Davis et al., 1987). Die MRF-Familie kann in 2 Gruppen unterteilt werden. Myf5- sowie MyoD-Expression determinieren im Rahmen der Embryogenese das benötigte Kompartiment nicht migratorischer Muskelvorläuferzellen. Myf6 und Myogenin werden in postmitotischen Myoblasten exprimiert und initiieren die terminale Differenzierung, welche mit der Fusion zu kontraktilen Myotuben beginnt. Jedoch sind weder MRF4- noch Myogenin-Expression notwendig für die Aktivierung des Differenzierungsprogramms, da in MRF4:Myogenin-Doppelmutanten einzelne fusionierte Myotuben detektiert werden können (Nabeshima *et al.*, 1993; Rawls *et al.*, 1998).



D

MDMTDGCQFSPSEYFYEGSCIPSPEDEFGDQFEPRVAAFGAHKAELQGSDDEEHVRAPTGHHQAGHCLMWACKACKRKSTTMD**RRK** AATMRERRRLKKVNQAFETLKRCTTTNPNQRLPKVEILRNAIRYIESLQELLREQVENYYSLPGQSCSEPTSPTSNCSDGMPECNS PVWSRKNSSFDSIYCPDVSNACAADKSSVSSLDCLSSIVDRITSTEPSELALQDTASLSPATSANSQPATPGPSSSRLIYHVL

**Abb.: 2:** Domänen und Sequenzen des Myf5-Proteins. Zwei der im Myf5 Protein vorkommenden Domänen, die basische und das Helix-Loop-Helix-Motiv sind hier in blau aufgezeigt. Die Ziffern bezeichnen die Aminosäurepositionen. Der rot dargestellte Teil des Transkriptionsfaktors ist in B dargestellt. B: Räumliche Konformation des Helix-Loop-Helix Motivs aus Pho4 von *Saccharomyces cerevisiae*. Die Helices sind mit grünen Zylindern ausgefüllt. C: Basensequenz der Myf5-cDNS der Maus, der kodierende Bereich ist fettgedruckt. Die basische Domäne (Basen 250 bis 292) und das HLH-Motiv (Basen 295 bis 408) sind unterstrichen. D: Aminosäureabfolge des Myf5 Proteins der Maus. Die basische Domäne (Aminosäuren 83 bis 97) ist fettgedruckt und unterstrichen und das HLH-Motiv (Aminosäuren 99 bis 136) ist ausschließlich fettgedruckt. Aus dem Internet heruntergeladene Daten des National Institute of Health (USA):

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?DATALIB=oasis\_sap&INPUT\_TYPE =access&GRAPH=2&FILTER=T&SEQUENCE=127626#ali1027100827

#### 4.2 Der Ablauf der Myogenese

Die gesamte Skelettmuskulatur des Wirbeltierkörpers sowie einige Muskeln des Kopfes gehen aus Somiten hervor. Somiten sind kugelige epitheliale Abschnürungen des unsegmentierten paraxialen Mesoderms, welche unter dem Einfluß von Signalen wie Shh (Sonic Hedgehog) aus den axialer Strukturen Neuralrohr und *Chorda dorsalis* sowie Wnts aus ektodermalen Strukturen in Dermomyotom und Sklerotom differenzieren (Cossu *et al.*, 1996; Christ and Ordahl, 1995; Brandt-Saberi and Christ, 2000). Das Sklerotom delaminiert im Rahmen der Differenzierung und stellt somit mesenchymale Zellen für die Bildung späterer Wirbelknochen und Bandscheiben bereit (Keynes and Stern, 1988). Das dermomyotomale Epithel kompartimentiert in das medial gelegene Dermotom, welches später Bestandteile der Dermis bildet, und die angrenzenden myotomalen Lippen von hoher proliferativer Aktivität (Chevalier *et al.*, 1977). Die spätere Muskulatur des Axialskeletts setzt sich aus epaxialer und hypaxialer Muskulatur zusammen (Chevalier *et al.*, 1977; Christ and Ordahl, 1995).

Die epaxiale Muskulatur besteht aus Interkostalmuskulatur, Körperwand und tiefer autochtoner Rückenmuskulatur und wird später in der Entwicklung vom *Ramus dorsalis* innerviert (Williams, 1910; Cossu *et al.*, 1996). Die nicht migratorischen Muskelvorläuferzellen der zukünftigen epaxialen Muskulatur entstammen der dorsomedialen Lippe des Dermomyotoms an dessen Innenseite sie entlang wandern und so das frühe Myotom bilden (Abb. 3). Die dorsomediale Myotomlippe steht unter dem induktiven Einfluß axialer Strukturen, wie dem Notochord und dem Neuralrohr, und exprimiert anfänglich ab dem Tage 9,5 *post coitum* (E 9,5 *p.c.*) E 8.0 *p.c.* Myf5. Die später vom *Ramus ventralis* innervierten hypaxialen Muskelgruppen stellen einen Großteil der Skelettmuskulatur dar und entstammen dem ventrolateralen Dermomyotom. Hypaxiale Muskelgruppen sind bis auf die hypaxiale Interkostalmuskulatur von cMet, MyoD und Lbx1 abhängig (Bladt *et al.*, 1995; Kablar *et al.*, 1997; Schafer and Braun, 1999; Brohmann *et al.*, 2000). Die ab E 9.75 *p.c.* auswandernden nicht migratorischen Muskelvorläuferzellen sind MyoD-positiv und verstärken das frühe Myotom, in dem sie sich wie epaxiale Zellen zwischen Dermomyotom und benachbartem Sklerotom lokalisieren (Chevalier *et al.*, 1977; Ohrdahl *et.al*, 1992). Auf Höhe der Extremitäten, an der anterioren Grenze der Vorderextremitäten sowie okzipital und cervikal delaminieren MyoD-negative Muskelvorläuferzellen aus dem Dermomyotom. Sie müssen weite Strecken zurücklegen, bevor sie ihre Zielorte wie Extremitäten, Diaphragma (Nishi S., 1967) und Zungenboden (Bladt *et al.*, 1995) erreichen und schließlich differenzieren (Cinnamon *et al.*, 1999). Die Schritte in der Entwicklung migratorischer myogener Linien sind im Einzelnen:

- 1. Determinierung eines Skelettmuskelvorläuferpools in der ventrolateralen Lippe des Dermomyotoms auf Höhe der Extremitäten, okzipital sowie cervikal.
- Delaminieren aus dem Dermomyotom und Wanderung zum Zielort (Chevalier *et al.,* 1977). Von der anterioren Grenze der Vorderextremitäten auswandernde migratorischen Zellen kreuzen mit dem Ziel *Septum transversum* dem späteren Diaphragma in die Arme einwandernde Muskelvorläuferzellen (Chevalier *et al.,* 1977).
- 3. Proliferation am Zielort, um den den Pool myogener Zellen zu verbreitern.
- 4. Beendigung der mitotischen Aktivität und durch MRF-Expression vermittelte sukzessive Differenzierung und terminale Fusion zu Myotuben (Smith *et al.*, 1994).

Ab Tag E 9,5 *p.c.* beginnt im frühen Myotom von MRF4- und Mogeninexpression begleitet die Fusion von Muskelvorläuferzellen zu primären Myotuben. Die differenzierenden Myoblasten verlassen hierzu den Zellzyklus und beginnen mit dem terminalen Differenzierungsprogramm. Nach Abschluß der primären Myogenese, dienen ab Tag E 14.0 *p.c.* die Primärmyotuben als eine Art Gerüst für weitere einwandernde Myoblasten (Harris *et al.,* 1989a; Kelly and Zacks, 1969; Kieny *et al.,* 1986; Ontell and Kozeka, 1984; Ross *et al.,* 1987). Sie lagern sich unter der Basallamina entlang der primären Myotuben an, fusionieren untereinander, um mit weiterem Wachstum der Lamina zu entsprossen und eine eigene Basallamina aufzubauen.



Abb. 3: Schema eines Transversalschnitts durch den dorsalen Teil eines Mausembryos auf Extremitätenhöhe im Stadium Tag E 10,0 *p.c.*. In graugrün ist das epitheliale Dermomyotom dargestellt, an dessen endständigen Lippen Muskelvorläuferzellen determiniert werden und anschließend delaminieren. Diese Zellen wandern entlang der Innenseite des Dermomyotoms und bilden so das in rot dargestellte Myotom. Die

hypaxialen Myoblasten der ventralen Lippe wandern in das Myotom oder migrieren zu den Extremitätenknospen. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Thomas Braun).

Ab E 17,0 p.c. werden die ersten Stammzellen der Satellitenlinie beobachtet. Diese Zellen unterscheiden sich von den Myoblasten, indem sie nicht mit den wachsenden Sekundärmyotuben fusionieren, sondern unterhalb der Basallamina in einen ruhenden Zustand übergehen. Die Satellitenzellen (S. 47, Abb. 24) sind durch stark kondensiertes Chromatin gekennzeichnet, welches von einem nur dünnen cytoplasmatischen Saum umgeben ist. Die Satellitenzellen werden dann postnatal benötigt, um im Falle von Muskelwachstum oder einer Regenerationssituation ein expandierbares Kompartiment myogener Zellen zur Verfügung zu stellen, um neue funktionale Muskulatur aufzubauen. Die Synzytien der Myotuben sind postmitotisch und können weder dedifferenzieren noch in einzelne mononukleäre Zellen zerfallen. 32% aller Myotubennuklei in neugeborenen Mäusen sind unterhalb der Basallamina aber außerhalb von Myotuben lokalisiert. Ab der achten Woche sind abhängig von Muskeltyp und Alter des Tieres 2-7% der sublaminaren Myotubenkerne Satellitenzellen. Cornelison et al. sehen ausschließlich c-met-positive Zellen als Satellitenzellen im engeren Sinne an und erhalten hierdurch einen Anteil an der Gesamtkernzahl von durchschnittlich ~1,4% für wt Mäuse (Cornelison et al., 2000). Andere Autoren sehen eine sublaminare Lokalisation außerhalb der Myotuben als hinreichend für die Identität von Satellitenzellen an und ermitteln somit in Abhängigkeit vom Muskeltyp einen Wert von 3-5% (Bischoff, 1986; Schulz et al., 1978; 1994).

#### 4.3 Die Eigenschaften des myogenen Transkriptionsfaktors Myf5

#### 4.3.1 Skelettmuskelentwicklung der Maus

Während der Embryogenese dient das Myf5-Gen anfänglich der Determinierung des Muskelvorläuferkompartiments und der Verbreiterung des mpc-Pools (mpc *engl.* muscle precursor cell für Muskelvorläuferzelle). Es wird ab Tag E 8,0 *p.c.* möglicherweise direkt durch Shh (Sonic Hedgehog) in der dorsomedialen Lippe des Dermomyotoms aktiviert. Shh ist an der Etablierung der epaxialen und der hypaxialen Domäne beteiligt, in dem es MyoDund Myf5-Expression räumlich beschränkt. Die Signaltransduktion des sekretierten Shh wird in den Zielzellen durch die epaxial exprimierten Transkriptionsfaktoren Gli1, Gli2 und Gli3 vermittelt (Borycki *et al.*, 1998). Ab Tag E 9,75 *p.c.* wird Myf5 auch in der ventrolateralen Lippe exprimiert und induziert seinerseits hier auch die MyoD-Expression (Borycki *et al.*; 1999). In Myf5-*Knock-out*-Mäusen wird die MyoD-Expression in Abwesenheit von Myf5 durch einen alternativen Weg aktiviert und vermittelt die Determinierung des myogenen Kompartiments zu (Weintraub *et al.*, 1991, Braun *et al.*, 1992; Kablar *et al.*, 1997).

Eine der vielfältigen Aufgaben des Myf5-Proteins ist nach der Verbreiterung des Pools determinierter Mpcs die Differenzierung einzuleiten. Myf5 kann nur in dem Fall die Expression von Myogenin direkt veranlassen, wenn die Zelldichte einen bestimmten Schwellenwert überschritten hat (Lindon *et al.*, 2001). Somit wird gewährleistet, das eine ausreichende Anzahl Myoblasten bereitgestellt wird, bevor durch das Ende der Proliferation die terminale Differenzierung eingeleitet wird. Eine der basischen Domäne benachbarte Region im Myf5-Protein vermittelt die Aktivierung des Myogeninpromotors. Andere muskelspezifische Gene können unabhängig von der Zelldichte durch Myf5 aktiviert werden, da ihre Expression der fortschreitenden Reifung von Myoblasten dient.

Durch Untersuchungen an heterozygoten Myf5<sup>nLacZ/wt</sup>Mäusen konnte durch histochemische Untersuchungen gezeigt werden, dass die Myf5-Expression nicht nur während der Embryogenese benötigt wird, sondern zusätzlich auch in der Muskulatur adulter Tiere aktiv ist (Tajbakhsh *et al.,* 1996a). In einer Regenerationssituation wird Myf5 benötigt, um das Gleichgewicht zwischen proliferierenden und differenzierenden Myoblasten aufrecht zu erhalten und die Differenzierung der aktivierten Satellitenzellen vorzubereiten. Die Generierung von Myoblasten aus aktivierten Satellitenzellen verläuft nach dem Vorbild der embryonalen Myogenese. Es kommen größtenteils die gleichen Gene zum Einsatz, so dass Erkenntnisse aus der Embryogenese direkt oder modifiziert auf die Regenerationssituation im adulten Gewebe übertragen werden können. Einflüße von Oberflächen-Ektoderm, unsegmentiertem/präsomitischem Mesoderm, Notochord und Bodenplatte des Neuralrohrs auf die Myogenese, wie sie im Embryo herrschen, sind im adulten Organismus hingegen nicht vorhanden. Hier spielen andere Signale wie von invadierenden Macrophagen sezernierte Faktoren und die Positionsinformation der einzelnen Zellen im Organismus eine die Regeneration regulierende Rolle.

#### 4.3.2 Die Rolle von Myf5 im Zellzyklus

Die beiden Transkriptionsfaktoren Myf5 und MyoD werden während des Zellzyklus annähernd antizyklisch exprimiert bzw. degradiert (Lindon *et al.*, 1998; Lindon *et al.*, 2000; Kitzmann and Fernandes, 2001). Das Myf5-Protein wird parallel zum CyclinA während der Phasen G1, S und G2 des Zellzyklus synthetisiert, und anschließend in der zweiten Hälfte der G2-Phase abgebaut (Abb. 4). Die Mitose wird durchlaufen und erst in der Mitte der nachfolgenden G1-Phase ist kein Myf5-Protein in der Zelle detektierbar. Da die Myf5-mRNS während des Zellzyklus konstant detektierbar bleibt, basiert die Regulation der Myf5-Oszillation auf einer periodischen Proteindegradation möglicherweise auch Translationskontrolle und nicht auf spezifischer Promotoraktivität.

Das Myf5-Protein weist zwischen der basischen DNS-Bindungsdomäne und der HLH-Dimerisierungsdomäne ein der D-Box (Destruction-Box; Glotzer *et al.;* 1991) homologes Motiv auf (von R93 bis Q101; Lindon *et al.,* 2000). Die D-Box ist ein 9 Aminosäuren umfassendes Erkennungsmotiv für die gezielte Proteindegradation im Zellzyklus. Die D-Box ist möglicherweise direktes Ziel des APC (Anaphase Promoting Complex), welcher sich im Vorfeld der Anaphase bildet. Hierbei handelt es sich um eine Ubiquitin-Ligase, die den Proteinabbau in S26-Proteasomen durch Ubiquitinierung des Zielproteins vermittelt. Das an die D-Box angelehnte Motiv ist in allen MRFs stark konserviert und weicht im Myf5-Protein in der neunten Position mit Q<sup>101</sup> von denen der anderen ab. Die D-Box ist im Falle von MyoD unwirksam, so daß es nicht zur gleichen Zeit wie Myf5-Protein abgebaut wird und somit antizyklisch zu Myf5 degradiert werden kann. Myf6 und Myogenin werden häufig in postmitotischen Zellen aktiv, so dass die von der D-Box vermittelte Proteindegradation nicht zum Einsatz kommt. Einige Autoren postulieren die ausschließlich postmitotische Expression von Myf6 in reifen Myotuben (Braun *et al.*, 1989b; Montarras *et al.*, 1991) und den Zellzyklusaustritt mit einsetzender Myogeninexpression (Andrés and Walsh, 1996). In diesen Fällen wäre die im Zellzyklus aktive D-Box völlig ohne Bedeutung für die Proteinstabilität von Myf6 und Myogenin. Die von Cornelison *et al.* vorgestellten RT-PCR-Ergebnisse in mitotischen Satellitenzellen (Abb. 6) könnten dieser Sichtweise widersprechen (Cornelison *et al.*, 2000). Die reine Anwesenheit der mRNS läßt hingegen keine Aussagen über die Anwesenheit des korrespondierenden Proteins zu (Cusella-De Angelis *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1994).



**Abb. 4:** MyoD und Myf5 werden in Myoblasten während des Zellzyklus annähernd antiphasisch kontrolliert exprimiert und abgebaut. Das MyoD-Expressionsprofil ist in grün dargestellt, das von Myf5 in rot. Die Zeitpunkte der Entscheidungen für die verlängerte Proliferation oder den Austritt aus dem Zellzyklus mit dem Ziel der Teilungsinaktivität (Quiescence) oder Differenzierung sind eingezeichnet. Auf der Zeitachse sind vom Zeitpunkt G0 bis zur Mitose die einzelnen Zellzyklusphasen aufgetragen, diese beanspruchen zusammen 20 Stunden (aus CMLS Kitzmann and Fernandez, 2000).

#### 4.4 Skelettmuskelentwicklung in MRF mutanten Mauslinien

In Myf5-defizienten Tieren unterbleibt die frühe Myotombildung. Mit der einsetzenden MyoD-Expression am Tag E 9,75 *p.c.* beginnt die Myogenese in der Myf5-Mutante mit einer Verzögerung von ca. 2 Tagen, obwohl der MyoD-Promotor nicht vom Myf5-Protein aktiviert werden kann (Abb. 5). Nebst der nicht migratorischen hypaxialen Linie, werden im Myf5-*Knock-out* zusätzlich auch epaxiale Muskelvorläuferzellen durch MyoD-Expression determiniert. Trotz der verzögerten Determinierung von Muskelvorläuferzellen werden alle Skelettmuskeln in Myf5-defizienten Mäusen angelegt und gehen unverändert aus dem Der-

momyotom der Somiten hervor. Bei der Geburt ist die Ausbildung der Skelettmuskulatur von Myf5-mutanten Embryonen nicht von der in Wildtypen zu unterscheiden (Braun *et al.*, 1994).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Expressionsdomänen der myogenen Transkriptionsfaktoren Myf5 und MyoD in Mausembryonen. In der ersten Spalte sind dorsale Transversalschnitte des Stadiums E 9,5 *p.c.* gezeigt. In den nächsten zwei Spalten sind Embryonen der Stadien E 11,5 *p.c.* und E 14,5 *p.c.* in Seitenaufsicht dargestellt. Die erste Zeile zeigt die Expression in der Wildtypsituation, die von MyoD vermittelten Muskelvorläuferareale sind in rot dargestellt, die von Myf5 vermittelten Bereiche in blau. Die Situation in der MyoD<sup>-/-</sup> Mutante ist in der mittleren Zeile zu sehen, die in der Myf5<sup>-/-</sup>Mutante in der letzten. (Nach Sabourin and Rudnicki, 2000 in Clinical Genetics).

In MyoD<sup>-/-</sup>Mäusen komplementiert Myf5-Expression die Determinierung der hypaxialen Myoblasten. Myf5 und MyoD können die Rolle des jeweils anderen Transkriptionsfaktors in dessen Abwesenheit übernehmen. Die Anwesenheit mindestens eines des beiden Faktoren ist für die Myogenese essentiell. Myf5<sup>m1/m1</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Doppelmutanten weisen bei der Geburt keine Skelettmuskulatur auf, da in ihnen kein Myotom determiniert wurde, welches Ursprung aller Myoblasten ist (Rudnicki *et al.,* 1996).

Die bisher beschriebenen Myf5-defizienten Mauslinien sind homozygot nicht lebensfähig. Für die in den Labors von Rudolf Jaenisch Myf5<sup>m1</sup> (Braun *et al.*, 1992) und Margaret Buckingham Myf5<sup>nlacZ</sup> (Tajbakhsh and Buckingham, 1994) generierten Myf5-*Knock-out*-Mäuse wurde ein perinatal letaler Phänotyp beschrieben. Die Neugeborenen sterben unerwartet aufgrund des Fehlens distaler Rippen. Die Myf5<sup>-/-</sup>Tiere ersticken unmittelbar nach der Geburt, da durch den nicht oder nur mangelhaft ausgebildeten Brustkorb die Lungen der Neugeborenen nicht mit Luft gefüllt werden können. Dieser Phänotyp ist überraschend, weil die Ursache für den in Myf5-Nullmutanten beobachteten Rippenphänotyp nur schwer zu erklären ist. Myf5 determiniert in Somiten das frühe Myotom und wird weder im Sklerotom noch im späteren Skelett exprimiert (Sassoon *et al.*, 1989). Da Myf5 ein Transkriptionsfaktor ist, und somit nicht direkt auf benachbarte Zellen wirken kann, handelt es sich bei der Ursache des Rippenphänotyps um keinen zellautonomen Effekt. Das durch Myf5-Expression determinierte Myotom grenzt direkt an das Sklerotom. Ein diffusibler Faktor aus dem neu angelegten Myotom könnte für die Induktion des Rippenblastems verantwortlich zeichnen. Die Größe des Sklerotoms, dem Primordium des Axialskeletts aus Wirbelkörpern, Bandscheiben und Rippen ist nicht durch die Myf5-Abwesenheit in mutanten Embryonen beeinflußt (Braun and Arnold, 1995). Die unauffällige Expression von sklerotomalen Markern wie Pax1, twist und HoxA7 in Myf5-Mutanten läßt darauf schließen, dass nicht die Bildung oder Zusammensetzung des Sklerotoms beeinflußt wird, sondern die lokale Induktion oder die Steuerung der Chondrogenese gestört ist (Grass *et al.*, 1996).

Im Entwicklungsstadium E 13,5 *p.c.* wird der Unterschied zwischen wt und mutanten Embryonen bei der Kondensation des Rippenmesenchyms deutlich, da die Rippen ab diesem Entwicklungsstadium mit Alcian-Blau angefärbt werden können. Das sich direkt an die bildenden Wirbelkörper anschließende Rippenblastem wächst nicht weit genug in ventraler Richtung aus, um die benötigte Länge der späteren Rippen zu gewährleisten (Braun *et al.*, 1992; Braun and Arnold, 1995; Grass *et al.*, 1996, Floss *et al.*, 1997). Grass *et al.* zeigen, dass die somitomale FGF4- und FGF6-Expression im Myf5-*Knock-out* fehlen, bis mit dem Einsetzen der MyoD-Expression ein komplementierendes myogenes Kompartiment bereitgestellt wird. Durch FGFs vermittelte Signaltransduktion ist in die Sklerotombildung involviert (Erlebacher *et al.*, 1995). Das FGF6-Expressionsmuster im Wildtyp entspricht bis auf eine Verzögerung von ca. 0,5 Tagen anfänglich dem von Myf5 (Marics *et al.*, 1989; Goldfarb, 1990; DeLapeyrière *et al.*, 1990; 1993). Die FGF6-Expression wird von dem Transkriptionsfaktor Myf5 aktiviert. Myf5 und FGF6 werden nur in Skelettmuskelvorläuferzellen überlappend exprimiert (Han and Martin, 1993). Myf5-Expression ist allein nicht ausreichend um die FGF6-Transkription zu aktivieren.

Grass *et al.* konnten wie schon zuvor Cohn *et al.* zeigen, dass die Wachstumsfaktoren FGF4 und FGF6 zusammen mit TGFβ-2 die chondrogene Differenzierung stimulieren (Cohn *et al.*, 1995). In Wildtypmäusen durch Myf5-Expression determinierten frühen Myotom wird

FGF6 als erster Fibroblasten-Wachstumsfaktor exprimiert. FGF6 wird von Muskelvorläuferzellen sekretiert und stellt somit einen potentiellen Kandidaten für die Stimulation der Sklerotomentwicklung in unmittelbarer Nachbarschaft zum Myotom dar.

Die Fibroblastenwachstumsrezeptoren FGFR1 und FGFR4 werden in der Skelettmuskulatur exprimiert (Peters *et al.*, 1992; Horlick *et al.*, 1992). Mutationen in den von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren aktivierten Rezeptoren FGFR1, FGFR2 und FGFR3 führen ebenfalls zu Fehlbildungen in der Knochenbildung. Signaltransduktionswege die auf FGFs basieren spielen eine wichtige Rolle bei der Koordination der Knochenformation. Beim Menschen führen Mutationen im FGFR1-Rezeptor zum Pfeiffer-Syndrom, welches durch Synostose und Extremitätendefekte charakterisiert ist (Jabs *et al.*, 1994). Skelettdefekte, wie sie für das Crouson-Syndrom oder das Jackson-Weiss-Syndrom beschrieben werden, sind mit Mutationen im FGFR2-Rezeptor korreliert (Reardon *et al.*, 1994; Muenke *et al.*, 1994). Eine Stopmutation des FGFR3-Gens führt beim Menschen zu thanotophorem Zwergwuchs Typ1, welcher unter anderem durch das Auftreten kurzer Rippen charakterisiert ist (Rousseau *et al.*, 1995). Andere Mutationen im FGFR3-Gen führen beim Menschen zu Achondroplasie, einer dominant vererbten Skelettmißbildung (Rousseau *et al.*, 1994; Shiang *et al.* 1994).

#### 4.5 Rippenblasteminduktion in Myf5-defizienten Mäusen

Eine mögliche Ursache für die fehlerhafte Rippenbildung in Myf5-defizienten Mäusen besteht in der um 1,75 Tage verspätet einsetzenden Bildung des frühen Myotoms. Da Myf5 nicht in sklerotomalen Zellen oder ihren Vorläufern exprimiert wird, wurde ein zeitlich sehr restriktives Fenster zur Induktion des Rippenblastems postuliert. Die mit der MyoD-Expression ab Tag E 9,75 *p.c.* einsetzende Myotomformation erfolgt nicht mehr rechtzeitig, um ein das Rippenwachstum induzierendes Signal an das Sklerotom zu vermitteln. Mit dem Ziel in Abwesenheit von Myf5 die Myotomformation ohne Verzögerung zu gewährleisten, werden andere MRFs vom Myf5-Promotor aus exprimiert (*Knock-in*-Ansatz). Die cDNS der myogenen Faktoren Myogenin bzw. MyoD wurden in den Myf5-Lokus inseriert, um durch den endogenen Myf5-Promotor exprimiert zu werden (Myf5<sup>myg</sup>: Wang *et al.*, 1996b; Wang *et al.*, 1997; Myf5<sup>MyoD</sup>: Tallquist *et al.*, 2000). Die Eigenschaft aller Mitglieder der MRF-Familie *in vitro* die Myogenese und die Expression der anderen MRFs zu vermitteln wird eingesetzt, um vom Myf5-Promotor getrieben die Myotombildung zu induzieren. Bei den einzigen bisher beschriebenen lebensfähigen Myf5-defizienten Mauslinien Myf5<sup>myg/myg</sup> und Myf5<sup>MyoD/MyoD</sup> handelt es sich um derartige *Knock-in*-Mutanten.

Myogenin-RNS wird im Wildtyp in allen Myf5-positiven Zellen ca. 12 Stunden nach dem Einsetzen der Myf5-Expression detektiert. Das Myogenin-Protein kann erst einen ganzen Tag später nachgewiesen werden (Cusella-De Angelis *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1994). Myf5 scheint den Myogenin-Promotor direkt zu aktivieren, ist aber nicht hinreichend, um allein die Myogeninexpression zu bewirken. Während der Embryogenese werden Myf5-negative Zellen, die MyoD exprimieren, ebenfalls Myogenin-positiv (Rudnicki *et al.*, 1992). Es besteht ein von Myf5 unabhängiger Weg, um Myogenin-Expression zu aktivieren. Das Myogenin-*Knock-in*-Allel kann die Myf5-Funktion übernehmen, da Myf5<sup>mygki/mygki</sup>Mäuse eine rechtzeitige aber stark abgeschwächte Myotomformation beobachtet wird (Y. Wang *et al.* 1996; 1997).

PDGFA (Platelet Derived Growth Factor  $\alpha$ ) vermittelte Signaltransduktion scheint in die Rippenentwicklung involviert zu sein. Der Rezeptor PDGFRa wird in Sklerotom, Dermatom und Myotom exprimiert (Orr-Urtreger and Lonai, 1992). Der im Wildtyp vom frühen Myotom sezernierte PDGFRa-Ligand PDGFA wurde unter Kontrolle des Myf5-Promotors gebracht, um in Myf5-Abwesenheit die Induktion des Rippenblastems zu vermitteln (Sorriano P., 1997; Tallquist et al., 2000). Die generierten Myf5-Knock-in-Mauslinien zeigen homozygot einen variablen Rippenphänotyp sind nicht lebensfähig. In Abhängigkeit von einer inserierten PGK-Neo-Selektionskassette (Myf5<sup>PDGFAN</sup>) wurde die Rippenentwicklung stärker gestört, als im Falle der ausschließlichen Insertion der PDGFA-cDNS (Myf5<sup>PDGFA</sup>). PDGFA hat einen positiven Einfluß auf die Rippenentwicklung, die Anwesenheit der PGK-Neo-Selektionskassette wirkt sich jedoch negativ aus. In Myf5-defizienten Mäusen ist bisher eine normale Rippenblasteminduktion beobachtet worden, wenn Mitglieder der MRF-Familie die frühe Myotombildung vom Myf5-Promotor aus zu vermitteln mögen (Myf5<sup>myg/myg</sup> und Myf5<sup>MyoD/MyoD</sup>). Das rechtzeitig gebildete Myotom kann mit dem Sklerotom in Kontakt treten und somit eine unauffällige Rippenentwicklung wie im Wildtyp hervorrufen.

#### 4.6 Myotuben und Satellitenentwicklung

Reife kontraktile Myotuben gehen aus der Fusion von ~ 300 Myoblasten hervor. Da Myotuben postmitotisch sind, können sie sich im Falle einer Verletzung nicht selber ersetzen. Sie weisen deshalb sublaminare Reservezellen, die sogenannten Satellitenzellen auf. Eine Satellitenstammzelle hat die Fähigkeit sich 80 Mal zu teilen (Grounds *et al.*, 1993). Nach Aktivierung durch Dehnung bzw. Beanspruchung/Übung beginnen Satellitenzellen sich zu teilen und generieren so einen Pool von Muskelvorläuferzellen (Mpcs), der dann der Muskelreparatur im Falle von Traumata oder durch Übung bzw. Belastung hervorgerufener Muskelhypertrophie dient (Appell *et al.*, 1988; Snow, 1990; Winchester *et al.*, 1991; Schulz und Mc-Cormick, 1994). Nach einer entsprechenden Anzahl von Zellteilungen, verlassen die Mpcs den Zellzyklus, um anschließend im Rahmen der Differenzierung zu fusionieren und somit intrafibrillär zum Aufbau neuer funktionaler Muskulatur beizutragen (Review zu Satellitenzellen: Zammit and Beauchamp, 2001). Mpcs können sowohl mit defekten Myotuben fusionieren, als auch *de novo* Myotuben generieren. Sie unterscheiden sich von Satellitenzellen darin, dass erstere das muskelspezifische Intermediärfilament Desmin exprimieren.

Die Satellitenzellen der Skelettmuskulatur zeigen durch ihre mesodermale Herkunft bedingt eine gewisse Plastizität in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen (Asakura et al.; 2001). Die Anwesenheit von Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) im Medium läßt die Satellitenzellen in vitro zu Osteoblasten werden, während sie unter adipogenen Bedingungen zu Fettzellen werden. Satellitenzellen, die myogene Marker wie MyoD, Myf5, Pax7 und Desmin exprimieren, nehmen in einer künstlichen extrazellulären Matrix wie Matrigel spontan das Schicksal von Fett- und Knochenzellen nebst dem von Muskelvorläuferzellen an. Aus Satellitenzellen in vitro generierte primäre Myoblasten nehmen ausschließlich ein Myozytenschicksal an. Der O2-Gehalt nimmt in vitro einen starken Einfluß auf das Schicksal von aktivierten Satellitenzellen (Csete et al.; 2001). Wird der O2-Gehalt in vitro von den üblichen 20% auf die in vivo herrschenden 6% reduziert, so wird die Differenzierung zu Osteoblasten und Adipozyten zurückgedrängt. Ursächlich für dieses geänderte Differenzierungsverhalten sind die stärkere Proliferation und die beschleunigte Expression von Mitgliedern der MRF-Familie in isolierten Satellitenzellen in vitro. Es mehren sich in letzter Zeit die Anzeichen für einen Einfluß von O2-regulierten Signaltransduktionswegen auf die Differenzierung in vivo.



Abb. 6: Zeitprofil der Expression der 4 MRF-Familienmitglieder in aktivierten Satellitenzellen. Die Expressionsdaten wurden mittels Einzelzell-Multiplex PCR erhoben. Oben links: Nur wenige Satellitenzellen exprimieren Myf5 oder MyoD. Oben rechts: Nach 24 Stunden sind die Zellen mitotisch aktiv und exprimieren initial entweder

Myf5 oder MyoD oder aber auch beide determinierenden myogenen Faktoren. Unten links: Nach weiteren 24 Stunden werden zusätzlich die differenzierenden myogenen Faktoren Myogenin und Myf6/MRF4 exprimiert. Nach 96 Stunden überwiegt der Anteil aktivierter Satellitenzellen (mpcs), welcher für alle 4 MRF-Familienmitglieder positiv ist (Nach Cornelison *et al.*, 2000).

Die in die Myogenese einmündende Determinierung und sukzessive Differenzierung aktivierter Satellitenzellen bedarf unter anderem der konzertierten Expression der 3 MRF-Familienmitglieder Myf5, MyoD und Myogenin (Abb. 6). Fehlt auch nur einer von ihnen in aktivierten Satellitenzellen, so gerät der regenerative Prozeß aus dem Gleichgewicht und Störungen treten in verletzter Skelettmuskulatur auf. Konzentrationsänderungen eines oder mehrerer MRFs haben das Potential Protein-Protein- oder Protein-DNS-Interaktionen zu stören. Aus MyoD<sup>-/-</sup>Mäusen isolierte Satellitenzellen sind nicht in der Lage in vitro zu regenerieren und bleiben Myf6-negativ (Cornelison et al.; 2000). In vivo führt diese Situation zu mangelhafter Regeneration im Falle von Verletzungen (Megeney et al.; 1996). Die bisher beschriebenen Myogenin- und Myf5-Knock-out-Allele sind homozygot alle letal (Hasty et al.; 1993; Nabeshima et al.; 1993; Braun et al.; 1992; Tajbakhsh and Buckingham, 1994; Tajbakhsh et al., 1996b). Eine Mauslinie mit einem Myogenin-Hypomorph ist homozygot ebenfalls nicht lebensfähig, da eine Myogeninkonzentration von weniger als 50% der Wildexpression zu einem Differenzierungsdefekt in einem Großteil der Myotuben führt (Vivian et al.; 1999). In der trotz milder Rippenfusionen und Rippengabelungen homozygot lebensfähigen und fertilen Myf6-Mutante ist die Myogenin-Expression um das 5-fache der Wildtypkonzentration erhöht (Zhang *et al.;* 1995). Die adulten Tiere sind nicht auf ihr Regenerationspotential getestet worden.

#### 4.7 Elektrophysiologie der Skelettmuskulatur

Elektrophysiologische Aufzeichnungen können Hinweise auf mögliche Ursachen von Funktionsanomalien der Skelettmuskulatur geben. Bei Vertebraten sind die Muskelfasern zu Motorischen Einheiten zusamengefaßt. Eine normale Skelettmuskelkontraktion entsteht durch die konzertierte Aktivität von einem Motoneuron, welches mit einer motorischen Endplatte um die 1000 Myotuben innerviert. Die Intensität einer Muskelkontraktion kann ausschließlich durch die Anzahl aktivierter Motorischer Einheiten oder aber die Frequenz der Nervenimpulse variiert werden. Kontrolliert werden die vermittelten Muskelkontraktionen durch Muskelspindeln.

Im Falle einer Myotonie wird eine Leiterbahn einer Motorischen Einheit durch eine Vielzahl neuerer kleiner verzweigter Einheiten ersetzt und die Amplitude des Potentials kann schnell den 100-fachen Wert im Gegensatz zur gesunden Situation überschreiten. Aufgezeichnete Aktionspotentiale sind im Falle einer Myopathie klein, spitzig und aufgesplittert. Im Konglomerat gehen einige Neuronen zugrunde, so dass viele sehr kleine Zacken in der Aufzeichnung eines Aktionspotentials sichtbar werden. Eine Regenerationssituation führt dann zu einer Verbreiterung der Aktionspotentiale, da mehrere Myotuben von einem Neuron innerviert werden, aber zusätzlich auch jede Myotube von mehreren Neuriten aktiviert wird. Eine Überlagerung der Aufzeichnungen von mehreren Motorischen Einheiten ist die Folge und erschwert somit die Zuordnung zu einer einzigen Motorischen Einheit.

#### 4.8 Einführung in die Cre/loxP-Rekombinationstechnologie

Konditionelle und gewebsspezifische Mutagenese können helfen frühletale Mutationen oder komplexe Phänotypen, die zur Anhäufung und Überlagerung von unterschiedlichen Entwicklungsfehlern führen, zu analysieren (Sauer *et al.;* 1998). Die dem Phagen *P1* enstammende Cre-Rekombinase erkennt palindromische Erkennungssequenzen deren Kernregion keiner Symmetrie gehorcht und somit den 34 bp langen loxP-Sequenzen (locus of X-ingover) eine Orientierung verleiht (Sternberg and Hamilton, 1981). Die Exzision eines DNS-Abschnitts, der zwischen zwei loxP-Sequenzen der gleichen Orientierung liegt, kann durch Cre-Rekombinaseexpression vermittelt werden (Sauer and Henderson, 1988). Nach erfolgreicher Deletion des von loxP-Sequenzen flankierten (gefloxten) Bereichs, verbleibt eine loxP-Sequenz am Ort der Exzision als eine Art Narbe zurück. Die Inversion eines gefloxten Bereichs wird möglich, indem die Orientierung der flankierenden loxP-Sequenzen gegenläufig gewählt wird. Chromosomenarmtranslokationen können forciert werden, durch die Platzierung der loxP-Sequenzen auf 2 unterschiedlichen Chromosomen. Ein instruktives Beispiel stellt die induzierbare chromosomale Translokation der Aml1 und ETO Gene dar (Buchholz *et al.;* 2000). Durch induzierbare oder gewebespezifische Promotoren, wird es möglich die Transgenaktivierung oder aber Beschränkung der Expression eines Zielgens auf bestimmte Gewebe zu definierten Zeitpunkten zu beschränken.

Cre Expressionsstämme: URL: http://www.mshri.on.ca/develop/nagy/Cre.htm).

#### 4.9 Das Ziel der vorliegenden Arbeit

Die bisher beschriebenen Myf5-defizienten Mauslinien sind homozygot nicht lebensfähig (Myf5<sup>m1</sup>: Braun *et al.;* 1992; Myf5<sup>nlacZ</sup>: Tajbakhsh and Buckingham, 1994). Mit dem Myf5<sup>nLacZ</sup>Allel konnte in heterozygoten Tieren histochemisch gezeigt werden, dass Myf5-Expression nicht nur während der Embryogenese benötigt wird, sondern zusätzlich auch in der Muskulatur adulter Tieren aktiv ist (Tajbakhsh *et al.;* 1996a). Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung von Myf5-defizienten Mausstämmen, welche die Analyse der Skelettmuskulatur in adulten Tieren ermöglicht. Die Lebensfähigkeit Myf5-defizienter Mäuse sollte auf zwei unterschiedlichen Wegen erreicht werden.

- Die Expression des Chondrogenese vermittelnden Fibroblastenwachstumsfaktor-6 (FGF6) durch den Myf5-Promotor (Myf5<sup>FGF6ki</sup>), sollte die Induktion des Rippenblastems in Abwesenheit des Myf5-Proteins vermitteln.
- (2) Ein weiterer Ansatz sollte von der konditionalen Geninaktivierung Gebrauch machen. Nach abgeschlossener Rippeninduktion durch Myf5-kodierte Myotomzellen sollte die Expression durch Zerstörung des Myf5-Gens auf genomischer Ebene unterbunden werden. Dieses Ziel sollte unter Verwendung des Cre/loxP-Systems erreicht werden.

Ausgangspunkt für diese Fragestellung war die von Dr. Markus Köster zur Verfügung gestellte Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mauslinie (Köster M., Dissertation, 1999). Diese Linie weist ein durch Cre-Rekombinaseexpression inaktivierbares Myf5-Allel auf. Es ist möglich die Myf5-Expression zu beliebigen Zeitpunkten zu unterbinden, und somit auch das Exzisionsereignis zeitlich erst nach abgeschlossener Rippenblasteminduktion (E 11.0 *p.c.*) auszulösen. Die Folge ist eine lebensfähige Myf5-defiziente Maus, die eine normale Myotombildung und daraus resultierende Rippenblastementwicklung durchlaufen hat. Vier unabhängige Ansätze wurden gewählt, um die Cre-Rekombinase mit dem Ziel der Myf5-Exzision zu exprimieren.

- (1) Durch den mittels synthetischer doppelsträngiger RNS induzierbaren Mx-Promotor einer transgenen Mauslinie (Kühn *et al.;* 1995).
- (2) Durch den muskelspezifischen Muskel-Creatin-Kinase-Promotor der die Cre-Rekombinase in gestreifter Muskulatur exprimiert (Brüning *et al.;* 1998).
- (3) Durch Adenovirus vermittelte Cre-Rekombinase-Expression wird eine lokale Begrenzung der Exzision möglich, um unabhängig von verfügbaren Promotoren und ihren Expressionsprofilen zu sein.
- (4) Durch konstitutive Cre-Rekombinase-Expression in der Cre-deleter Mauslinie wird zum frühestmöglichen Zeitpunkt der Embryogenese die Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Allels ausgelöst (Schwenk *et al.;* 1995). Eine derartig frühe Deletion des Myf5<sup>loxP</sup>Allels sollte zu einer Phänokopie der bisher beschriebenen Myf5defizienten Mauslinien mit dem bei ihnen beobachten unvollständigen Brustkorb führen.

# 5 Material und Methoden

#### 5.1 Material

NAP-5<sup>TM</sup> Säule (Sephadex<sup>®</sup> G-25-Säule)

Pharmacia Biotech (Schweden)

#### 5.1.1 Chemikalien

Handelsübliche Chemikalien in Analysequalität und Biochemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer Mannheim (Mannheim), Invitrogen (Leek, NL), Merck (Darmstadt), Molecular Probes (Göttingen), New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), Promega (Mannheim), Quiagen (Hilden), Roth (Hamburg/Karlsruhe), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Sigma Chemie (Deisenhofen), Stratagene (Heidelberg).

#### 5.1.2 Radiochemikalien

Amersham Buchler (Braunschweig) und NEN Lifescience (Köln) wurden als Hersteller für die folgenden Radiochemikalien genutzt:

- [γ-<sup>32</sup>P] dCTP (6000 Ci/ml in H<sub>2</sub>O)
- $[\alpha {}^{32}P] dATP (6000 Ci/ml in H_2O)$

## 5.1.3 Spezifische Reagenzien

Accumate<sup>™</sup> Dekalzifizierungslösung

Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente 150 U (200 μl) Avertin<sup>®</sup> 2,2,2-Tribromoethyl Alkohol BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) Blottingpapier GB-003 Digoxigenin-11-UTP DNS Polymerase I Large (Klenow) Einmalfilter Minisart NML (0,2 und 0,45 μm) Entellan<sup>®</sup> Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie Faltenfilter Fast Red Tabletten (Best.Nr. 1496 549) FIAU Geneticin G-418 Hefe-tRNS Kodak D-19 Entwickler Mitomycin C

(RDO Rapid decalcifying solution; Sigma Diagnostics ST.Louis, MO, USA). Boehringer (Mannheim) Aldrich T4,840-2 Boehringer (Mannheim) Schleicher und Schüll (Dassel) Boehringer (Mannheim) Promega (WI, USA) Sartorius (Göttingen) Merck Schleicher und Schüll (Dassel) Boehringer Mannheim GmbH. (Bristol-Myers Squibb Company) (Gibco BRL) Boehringer (Mannheim) Kodak (Frankfurt am Main) Fa. Sigma

NBT (4-Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid) Boehringer (Mannheim) Objektträger und Deckgläser Schütt (Göttingen) Polyfreeze<sup>TM</sup> Tissue freezing medium<sup>TM</sup> Polysciences, Inc. (Warrington PA, USA) Polyamidmembran Nytran Plus Schleicher und Schüll (Dassel) Kodak (Frankfurt am Main) Rapid-Fix Reaktionsgefäße Schütt (Göttingen) Röntgenfilme Kodak (Frankfurt am Main) SDS Bio-Rad (München) Aldrich 24,048-6 tert-amyl-Alkohol Tween-20 USB (Bad Homburg) Camon (Wiesbaden) Vectabond-Reagent X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoly-D-galactopyranosid) Fa. Roth (Deutschland) Zellkulturschalen und Kryoröhrchen Nunc (Roskilde, Dk)

## 5.1.4 Lösungen

- Avertin<sup>®</sup>: 10g 2,2,2-Tribromoethyl Alkohol (Sigma-Aldrich T4,840-2) werden in tert-amyl-Alkohol (Aldrich 24,048-6) gelöst, um eine 100%-ige Stammlösung, die unter Lichtabschluß bei 20°C eingefroren wird, herzustellen (Hogan *et al.*, 1994). Für die Verwendung als Anästhetikum für Mäuse wird eine 2,5%-ige Lösung in H<sub>2</sub>O erstellt, die dann mit 15 μl pro Gramm Körpergewicht mit einer 27G Kanüle interperitoneal injiziert wird.
- FIAU: Selektionsdroge f
  ür die *in vitro* Negativselektion von ES-Zellen mittels HSVtk-Kassette. Eine 10.000-fach Stocklösung enthält 2,5 mM FIAU in 15 mM NaOH (Bristol-Myers Squibb Company).
- Geneticin G-418: Droge f
  ür die *in vitro* Selektion von ES-Zellen mittels PGK-Neo-Kassette; Die 10-fach Stammlösung mit einer Konzentration von 4 mg/ml in Hepes-Puffer (Gibco BRL) ist maximal 7 Tage bei 4°C haltbar.
- Mitomycin C: Mitomycin C ist ein Spindelgift und wird als Mitosehemmer f
  ür die Arretierung von Feederzellen in der ES-Zellkultur verwendet. 2 mg Mitomycin C (Fa. Sigma) werden in 200 ml DMEM gelöst.
- pIpC: Synthetische doppelsträngige RNS (Polyionisin-Polycytidinsäure) zur Induktiondes Mx-Promotors *in vivo* (Kühn *et al.* 1995, Abschnitt 4.2). Die Konzentration der Lösung beträgt c = 1 mg/ml. 15 μg pIpC werden je Gramm Körpergewicht interperitoneal injiziert.
- Trypsin-EDTA: Sterilfiltrierte 2,5%-ige 10-fach Stocklösung mit 1 mM EDTA in HEPES-Puffer. 1-fach Trypsin/ETDA wird benutzt, um Zellen *in vitro* aus ihren Ku-

turschalen zu lösen. Trypsin der Firma Gibco ist auf Mycoplasmen getestet und wird bei –20°C gelagert.

#### 5.1.5 Antikörper

- MF20: Monoklonaler Antikörper gegen Myosin-Schwere-Kette (Schafer K. und Braun T., 1999).
- MY32: Monoklonaler Antikörper gegen Myosin-Schwere-Kette (Schubert, 1991) (Fa. Sigma).

#### 5.1.6 Bakterienstamm

 E. coli XL1 Blue (Stratagene, Heidelberg): recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>

#### 5.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurde von der Firma Eurogentec (Köln) erstellt.

## 5.1.8 Kits

Die nachfolgenden Kits wurden entsprechend der mitgelieferten Bedienungsanleitungen verwendet.

•	Perfectprep <sup>®</sup> Gel Cleanup Kit	Eppendorf Hamburg.
	Isolierung von DNS aus Agarosegelwürfeln.	
•	Quiagen <sup>®</sup> Maxiprep Kit	Quiagen Köln.
	Isolation von Plasmid-DNS aus Bakterien.	
•	Quiaex II <sup>®</sup> Agarose Gel Extraction Kit	Quiagen Köln.
	Isolierung von DNS aus Agarosegelwürfeln.	
•	Trichrome Stain	Fa. Sigma.
	Histochemische Anfärbung von Gewebeschnitten.	
•	Vectastain <sup>®</sup> Elite <sup>®</sup> ABC Kit	Vector Laboratories, CA, USA.

Auf der enzymatischen Aktivität von Merettich-Peroxidase basierendes Detektionssystem von Antikörpern in der Immunhistochemie. Eine Amplifikation des Signals wird durch die Interaktion von Avidin und Biotin zu größeren Komplexen erreicht. Als Substrat der Merettich-Peroxidase wurde Diaminobenzidin eingesetzt, welches bei Bedarf noch mit NiCl<sub>2</sub> versetzt wurde, um eine schwarze Färbung zu erreichen.

#### 5.1.9 Mauslinien

- B6D2F1: Die Weibchen dieser Wildtypmauslinie mit agoutifarbenem Fell wurde verwendet, um nach Verpaarung mit vasektomierten Männchen als scheinschwangere Rezipienten für die Aufnahme von Blastocysten nach erfolgreicher Blastocysteninjektion zu dienen. Diese als Ammenmütter genutzten Tiere stellen die F1 Generation einer Verpaarung der Inzuchtmauslinien C57Bl6/6J und DBA dar (Harlan Winkelmann).
- C57Bl6/6J: Diese Wildtypmäuse mit schwarzem Fell wurden untereinander verpaart, um am Tag E 2,5 *p.c.* Blastocysten für die Generierung von transgenen Tieren zu erhalten. Die Weibchen dieser Mauslinie wurden desweiteren verwendet, um mit für das Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allel chimären Männchen verpaart zu werden. Ziel war es Nachkommen mit agouti Fellfarbe zu generieren, die dann mittels Southern Blot Analyse genotypisiert wurden, um zu bestimmen, ob sie das Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allel tragen. Die zur Generierung der Chimären Mäuse verwendeten ES-Zellen entstammen einer agoutifarbenen Mauslinie (Harlan Winkelmann).
- Myf5<sup>loxP/loxP</sup>: Diese Mauslinie wurde von Markus Köster im Labor von Thomas Braun generiert. Sie entspricht einer Wildtypmaus, bis auf die Insertion von zwei loxP-Erkennungssequenzen die das Exon1 im Myf5-Lokus flankieren und einer zusätzlichen BamHI-Restriktionsschnittstelle im 5'-Bereich des Myf5-Basalpromotors (Köster M., Dissertation, 1999; Kaul *et al.;* 2000).
- Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>: Lebensfähige Myf5-Nullmutante die durch Verpaarung von Myf5<sup>loxP/loxP</sup>- und Cre-deleter-Mäusen, sowie anschließende Rückkreuzung der doppeltheterozygoten F1-Generation auf die Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mauslinie generiert wurde (Kaul *et al.;* 2000). In diesen Mäusen fehlt durch die Exzision das erste Myf5-Exon sowie 2 bis 3 kb stromaufwärts gelegene Sequenzen, die den Basalpromotor enthalten.
- Myf5<sup>m1</sup>: Von Thomas Braun generierte Myf5-Nullmutante. Durch Integration einer PGK-Selektionskassette und teilweise Deletion genomischer Sequenzen des ersten Exons, wird die Produktion eines biologisch aktiven Myf5-Proteins verhindert (Braun *et al.;* 1992). Homozygote Träger dieser Mutation bilden keinen funktionsfähigen Brustkorb aus und sterben deshalb direkt nach der Geburt. Freundliche Gabe von Thomas Braun.

- MRF4<sup>m1</sup>: Von Thomas Braun generierte MRF4-Nullmutante. Das Nullallel wurde durch Integration einer PGK-Selektionskassette und teilweise Deletion genomischer Sequenzen des ersten Exons im MRF4-Lokus generiert (Braun *et al.;* 1995). Für das MRF4<sup>m1</sup>Allel homozygote Tiere sind durch das Fehlen eines funktionsfähigen Brustkorbs nicht lebensfähig. Freundliche Gabe von Thomas Braun.
- MyoD-/-: Diese MyoD-defiziente Mauslinie wurde von Michael A. Rudnicki generiert (Rudnicki *et al.;* 1992). Homozygote Mutanten sind lebensfähig und fertil. Freundliche Gabe von Michael A. Rudnicki.
- MCK-Cre (auch FVB nls-Cre): Diese Mauslinie weist eine muskelspezifische Cre-Rekombinaseexpression auf. Vermittelt wird diese durch ein 6,5 kb großes Fragment des Muskel-Creatin-Kinase-Promotors (MCK) mit nachgeschalteter Kernlokalisationssequenz und der Cre-Rekombinase-cDNS (Brüning *et al.*, 1998). Die Mauslinie trägt eine zufällige Integration dieses Transgens im Genom. Freundliche Gabe von Thomas Braun.
- Mx-Cre: In dieser Mauslinie kann die Cre-Rekombinaseexpression durch Induktion des Mx-Promotors aktiviert werden. Die Induktion kann mittels Injektion von doppelsträngiger synthetischer RNS wie pIpC oder der Interferone IFNα oder IFNβ erfolgen (Kühn R. *et al.*, 1995). Freundliche Gabe von Klaus Rajewsky.
- Cre-deleter: Die konstitutive Cre-Rekombinaseexpression in dieser Mauslinie vermittelt die Exzision aller gefloxten DNS Bereiche während der Präimplantationsphase der Embryogenese. Die Cre-Rekombinaseexpression wird von einem β-Aktin Enhancer-Element und einem humanen Zytomegalieviruspromotor (CMV) mit nachgeschalteter β-Globin-Polyadenylierungssequenz aus dem Kanninchen getrieben (auch CAGG genannt Niwa *et al.*, 1991; Thomsen *et al.*, 1984). Das Transgen ist nach dem Zufallsprinzip in das X-Chromosom integriert und führt im Falle einer homozygoten Situation zu verringerter Fertilität der Weibchen (Schwenk *et al.*, 1995). Freundliche Gabe von Klaus Rajewsky über H. von Melchner (Universität Frankfurt).
- Myf5<sup>FGF6ki</sup>: Diese Mauslinie wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert (Kaul *et al.*, 2000). Die korrespondierenden ES-Zellen mit inserierter FGF6-cDNS und Doppelselektionskassette wie in Abb. 33 C wurden von Markus Köster zur Verfügung gestellt.

- Pln13: LacZ-Reportermaus mit stummem LacZ-Transgen aus dem Labor von H. von Melchner Universität Frankfurt. Ein von loxP-Erkennungssequenzen flankiertes Stopkodon ist zwischen Promotor und LacZ-Gen inseriert. Durch Cre-Rekombinaseexpression wird das Stop-Codon aus dem Leseraster entfernt und das LacZ-Gen exprimiert.
- LacZ-tg: LacZ-Reportermaus aus dem Labor von Anton Berns. Ein von loxP-Erkennungssequenzen flankiertes Stopkodon ist zwischen Promotor und LacZ-Gen inseriert. Durch Cre-Rekombinaseexpression wird das Stop-Codon aus dem Leseraster entfernt und so die LacZ-Expression in der Reportermaus aktiviert. Freundliche Gabe von Anton Berns.
- Z/AP: Reportermauslinie für Detektion von durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombinationsereignisse. Eine konstitutive und annähernd ubiquitäre LacZ-Expression wird durch den Enhancer des Cytomegalievirus (CMV) und den β-Aktinpromotor aus dem Hühnchen, mit der nachgeschalteten β-Globin-Polyadenylierungssequenz aus dem Kanninchen getrieben (Niwa *et al.*, 1991). Das LacZ-Gen ist von loxP-Sequenzen flankiert, so dass eine humane plazentale Alkalische Phosphatase exprimiert wird, nachdem die LacZ-Kassette durch Cre-Rekombinase vermittelt ausgeschnitten wurde (Lobe *et al.*; 1999). Freundliche Gabe von Andras Nagy.
- Mdx: Muskeldystrophie Maus. Diese Mauslinie wird häufig als Modell für die beim Menschen vorkommende Muskeldystrophie vom Dychenne-Typ verwendet. Diese Mauslinie weist einen Basenaustausch im Exon 23 des X-chromosomal lokalisierten Dystrophingens auf, der zum Abbruch der Translation führt (Bulfield *et al.;* 1984; Sicinski *et al.;* 1989). Betroffen von dieser Mutation ist somit die fehlende 427 kDa Isoform des Dystrophingens, welche im Wildtyp in der Skelettmuskulatur und im Gehirn exprimiert wird. Freundliche Gabe von Thomas Braun.

#### 5.1.10 Viren

- Adv5-Cre: Adenovirus Serotyp 5 mit inseriertem Cre-Transgen von Frank Graham (McMaster Universität, Kanada)
- Adv5-LacZ: Adenovirus Serotyp 5 mit inseriertem LacZ-Transgen von Thomas Eschenhagen.

#### 5.1.11 Zellkulturlinien

- NIH 293: Diese Zellen wurden am National Institute of Health Washington USA erstellt und weisen ein nach dem Zufallsprinzip integriertes geschertes Adenovirusgenom auf. Diese Zellen werden als Verpackungszellinie für replikationsinkompetente Adenoviren verwendet. Freundliche Gabe von Thomas Braun.
- ES-Zellen: Die ES-Zellinie J1 (Li et al.; 1992) entstammt dem Mausstamm 129 Sv (A/A; C/C; Haplotyp: X/Y). Aus diesen ES-Zellen generierte chimäre Tiere sind in der Regel männlich. In diese wurde von Markus Köster das Myf5<sup>FGFki</sup>-Zielkonstrukt pγ mittels Elektroporation eingebracht. Freundliche Gabe von Thomas Braun.
- Embryonale Feederzellen: Diese die ES-Zellen mit allen essentiellen Faktoren versorgenden Zellen werden aus Embryonen des FVB/β2-Mikroglobin<sup>-/-</sup>
   Mausstammes generiert, da sie in beiden Allelen eine Neomycin-Kassette tragen und somit gegen die Selektionsdroge G-418 resistent sind (Zijlstra et al. 1990).

#### 5.1.12 Vektoren

- p+15: Auf dem pKS Plasmid basierender Vektor mit der 5' von Myf5 gelegenen Probe 2 (Köster M., 1999). Die Probe aus diesem Vektor wurde zum Genotypisieren der Mauslinien Myf5<sup>FGF6ki/wt</sup> (Abb. 32) und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> (Abb. 7) verwendet.
- pγ: Zielvektor, mit dem die ES-Zellen *J1* für die Generierung der Myf5<sup>FGF6ki/wt</sup> Mauslinie transfiziert wurden. Die FGF6-cDNS wurde in das erste Exon des Myf5-Lokus inseriert. Die Translation der durch den Myf5-Promotor exprimierten mRNS wird durch eine 5'-seitige IRES (internal ribosomal entry site) initiiert. Siehe Abb.: 32 A.
- pdomyXhoI: Dieser Vektor beinhaltet stromabwärts des Myf5-Exon1 gelegene genomische Sequenzen, die Exone 2 und 3 des Myf5-Lokus bis zur XhoI-Schnittstelle. Freundliche Gabe von M. Köster.
- pGH1: Vektor mit gefloxter PGK-neo:HSV-tk-Selektionskassette die in die Zielvektoren inseriert wurde (Gu *et al.;* 1993).
- pGPSA-AfIII: Dieser Vektor trägt einen genomischem Abschnitt stromaufwärts des Myf5-Lokus und Myf5 Exon1. Stromabwärt des Myf5 Exon1 liegt eine gefloxte PGK-Neo:HSV-tk-Kassette. Freundliche Gabe von M. Köster.
- pIND-Cre: Dieser Vektor enthält eine Cre-cDNS, die als Sonde zum Genotypisieren der Mauslinien MCK-Cre, Mx-Cre und Cre-Deleter verwendet wurde (Köster M., 1999).
- pLXEG: Dieser Vektor trägt intergenische Sequenzen vom letzten Exon des Myf6/MRF4-Lokus bis zur Sall Schnittstelle 2 kb stromaufwärts vom Exon1 des Myf5-Lokus. Freundliche Gabe von M. Köster.
- pM#3: Auf dem pKS Plasmid basierender Vektor mit vom Myf5-Lokus stromabwärts gelegenen Sequenzen als exogene Probe 1 (Köster M., 1999). Diese Probe wurde auch zum Genotypisieren der Mauslinien Myf5<sup>FGF6ki/wt</sup> (Abb. 32) und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> (Abb. 7) verwendet. (Freundliche Gabe von R. Zweigerdt).
- pMC-Cre: Für *in vitro* Exzision der Doppelselektionskassette des Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allels verwendeter Cre-Rekombinaseexpressionsvektor von F. Schwenk (Gu *et al.;* 1993).
- pPMFGF6(cDNS): Die Vektor enthält die Sequenz der murinen FGF6-cDNS (Han and Martin, 1993). Freundliche Gabe von Gail R. Martin (San Franzisko, USA).
- pRCAS(A)AP: Vektor aus dem die AP-Sonde zwecks Genotypisierung der Z/AP-Mäuse mit dem Restriktionsenzym ClaI geschnitten wurde. Freundliche Gabe von T. Braun.
- pWH9: Dieser Vektor enthält eine interne ribosomale Anlagerungssequenz (IRES) die in den Zielvektor für das Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allel inseriert wurde, um die Translation der FGF6-cDNS zu ermöglichen (Schafer and Braun, 1999).

### 5.1.13 Vektoren zur Erstellung von Riboproben

pMfgf6'1: FGF6-Sonde (Han and Martin, 1993; Grass *et al.;* 1996). Für die Synthese einer Riboprobe wurde das Plasmid pMfgf6'1 mit BamHI (Gegensinn-Probe) linearisiert und die T3-RNS-Polymerase verwendet. Um zu Kontrollzwecken eine Sinn-Riboprobe zu darzustellen wurde das Plasmid pMfgf6'1 mit PstI linearisiert und die T7-RNS-Polymerase verwendet. Freundliche Gabe von G. R. Martin, San Franzisko, USA.

- pMyf51: Myf5-mRNS f
  ür Wholemount-*in-situ*-Hybridisierung, die zum Erstellen einer Riboprobe verwendet wurde. Zum Linearisieren des Plasmids wurde die im 5'-seitigen untranslatierten Bereich des Myf5-Gens befindliche ScaI-Schnittstelle verwendet (Ott *et al.*, 1989).
- pMyo: Dieser Vektor trägt einen Myogenin-Sonde aus der Ratten-cDNS. Freundliche Gabe von Woody Wright (Western Medical Center, Texas, USA).

# 5.2 Methoden

### 5.2.1 Standardbedingungen und Methoden der Molekularbiologie

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden den Sicherheitsbestimmungen entsprechend durchgeführt. Soweit nicht nicht anders ausgeführt, wurden alle Standardtechniken entsprechend der Methodensammlungen "Molecular Cloning" (Sambrock *et al.;* 1989) bzw. "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel *et al.;* 1992) durchgeführt. Hierzu wurden alle verwendeten Lösungen mit H<sub>2</sub>O bidest. oder H<sub>2</sub>O aus einer Milli-Q Ionenaustauscheranlage erstellt und anschließend autoklaviert oder sterilfiltriert, um die Lösungen keimfrei zu halten. Die Lösungen wurden entsprechend den Versuchsanforderungen vor der Benutzung auf die notwendige Temperatur gebracht.

### 5.2.2 Extraktion von genomischer DNS aus Mausschwanzspitzen

Zur Gewinnung von biologischem Material wurde Schwanzgewebe von Mäusen biopsiert, oder aber die Embryonalhülle von noch ungeborenen Mäusen eingesetzt. Nach Inkubation des biologischen Materials in 0,5 ml Lysispuffer ÜN bei 55°C, wurde die DNS durch Zugabe von 400 µl Isopropanol gefällt. Die DNS-Flocke wurde um eine Kanüle gewickelt und in 100 µl TE gelöst und zur Genotypisierung weiter prozessiert.

#### 5.2.3 Gewinnung von genomischer DNS aus Organen

100 mg bis 2 g frisch präpariertes Gewebe wurden in einen zur Hälfte mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser zu feinem Pulver zermahlen. Das Pistill wurde zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt. Das Pulver wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, damit der Stickstoff abdampfen kann. Pro 100 mg Gewebe wurde 1 ml Saccharose/Proteinase K Lysispuffer dazugegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die durch die freigesetzte DNS viskose Lösung wurde am nächsten Tag mit 10 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol Gemisch (25:24:1) durch vorsichtiges Schwenken extrahiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit einem Volumen Isopropanol die DNS gefällt und auf eine Kanüle aufgewickelt. Die DNS wurde mehrfach mit der Kanüle in 70% EtOH geschwenkt und anschließend in 2 ml TE pH 7,4 gelöst. Die vollständig gelöste DNS wurde mit 2 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol Gemisch (25:24:1) geschüttelt und 5 Minuten bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit 0,3 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen absolutem EtOH die DNS gefällt. Die auf eine Kanüle aufgewickelte DNS wurde mehrmals in 70% EtOH gewaschen und ohne einen Trocknungsschritt in TE pH 7,4 gelöst und auf eine Konzentration von 200 µg/ml eingestellt.

Saccharose/Proteinase K Lysispuffer:

27% Saccharose 1x SSC 1mM EDTA 1% SDS 200 μg/ml Proteinase K

# 5.2.4 Elution von DNS aus Agaroseblöcken

Im Anschluß an eine restriktionsenzymatische Spaltung von DNS wurde letztere gelelektrophoretisch aufgetrennt und die durch Beimengung von Etidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemachte DNS-Bande aus dem Agarosegel geschnitten.

# 5.2.4.1 Elektroelution

Die Agarosegelwürfel wurden einer für 1 h einer Hochspannungsgelelektrophorese bei 80V in einer Elektroelutionskammer unterzogen. Die DNS wanderte aus der Agarose in eine Salzfalle und sammelte sich in einer mit Ficol blau angefärbten 3 M NaAcetat-Lösung. Die TAE-Lösung wurde aus der Kammer sorgsam abgesaugt und die in der Kammer verbleibende DNS-Lösung mit einer 1 ml Spritze abgesogen. Nach Zugabe von 2 µl Glykogen und 1 ml EtOH wurde die DNS bei –20°C für 30 min. gefällt. Im Anschluß an eine Pelletierung mittels Zentrifugation für 10 min. wurde die DNS bei RT für 15 min. getrocknet und in 100 µl THE resuspendiert. Nach Beimengung von 100 µl 4 M NH<sub>4</sub>Acetat und 400 µl Isopropanol wurde die DNS bei RT für 10 min. gefällt und anschließend für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das getrocknete DNS-Pellet in 10 µl TE gelöst.

### 5.2.4.2 DNS Extraktion mittels DNS-Extraktionkit

War die anschließend durch Elektroelution gewonnene DNS nicht prozessierbar, so wurden erneut Agarosewürfel erstellt, die das gewünschte DNS-Fragment enthalten. Die DNS wurde dann mittels DNS-Extraktionkit (Perfectprep<sup>®</sup>Gel Cleanup Kit Eppendorf Hamburg) laut Beschreibung des Herstellers gewonnen und entsprechend den Bedürfnissen des jeweiligen Experiments weiter verarbeitet.

# 5.2.5 Die Klonierung des Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allels

FGF6-cDNS wurde unter Kontrolle des endogenen Myf5 Promotors zur Expression gebracht, um die Induktion des Rippenblastems in Myf5-Abwesenheit zu vermitteln. ES-Zellen die das Targeting-Konstrukt pγ erfolgreich in den Myf5-Lokus inseriert hatten wurden von M. Köster zur Verfügung gestellt. Hier soll die verfolgte Klonierungsstrategie aufgezeigt werden.

Eine Interne Ribosomale Eintritts Stelle (IRES) wurde aus dem pPWH9 Vektor in den mit BamHI linearisierten und mittels CIP (Calf Intestine Phosphatase) dephosphorylierten pPMFGF6(cDNA) Vektor stromaufwärts der FGF6cDNS kloniert (Han and Martin, 1993). Das pWH9 Plasmid wurde zu diesem Zweck mit EcoRI linearisiert und die überhängenden einzelsträngigen Enden mit Klenow DNS-Polymerase (großes Fragment) aufgefüllt. Es wurden dann an die stumpfen DNS-Enden BamHI-Linker legiert und die IRES mittels BamHI-Verdau aus dem Vektor geschnitten. Die IRES wurde anschließend in den mittels BamHI-Verdau linearisierten pPMFGF6(cDNA) legiert. Aus dem so erstellten pIRESFGF6 Plasmid wurde die aus IRES und FGF6cDNS bestehende Kassette mittels EcoRI und BamHI ausgeschnitten und die Enden mit Klenow DNS-Polymerase aufgefüllt.

Diese Kassette wurde in die ScaI-Schnittstelle im Myf5-ExonI inseriert. Das resultierende Plasmid enthielt stromaufwärts gelegene genomische Sequenzen des Myf5-Lokus und das das erste Exon von Myf5, welches von einer loxP-Erkennungssequenz gefolgt wurde. Das Exon1 wurde durch die Insertion der IRES-FGF6cDNS-Kassette zerstört. Aus dem so generierten Vektor pLIF wurde der modifizierte Myf5-Lokus mit AfIII ausgeschnitten und in den ebenfalls mit AfIII linearisierten Vektor pGPSA-AfIII inseriert. Stromabwärts von Myf5-Exon1 und der flankierenden loxP-Sequenz befanden sich im p $\alpha$ -Plasmid eine HSV-tk- und eine PGK-Neo-Kassette sowie eine weitere loxP-Sequenz.

Aus dem Plasmid pdomyXhoI wurde ein 3 kb großer Bereich genomischer Myf5 Sequenzen die auch die Exone 2 und 3 enthalten mittels XhoI-Verdau ausgeschnitten. Diese genomischen Bereiche wurden stromabwärts der zweiten loxP-Sequenz in die XhoI-Schnittstelle des p $\alpha$ -Plasmids inseriert. In das so erhaltene p $\beta$ -Plasmid wurden dann weitere 5,9 kb genomischer Sequenzen des Myf5-Lokus in die stromaufwärts gelegene SalI-Schnittstelle inseriert. Der resultierende Zielvektor p $\gamma$  weist eine zusätzliche loxP-Sequenz 2 kb stromaufwärts vom Myf5-Exon1 auf, da die genomischen Bereiche aus dem pLXEG-Plasmid stammen.

# 5.2.6 ES-Zellkultur

### 5.2.6.1 Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

Der von Markus Köster erstellte ES-Zellklon #7 mit dem homolog in den Myf5-Lokus integrierten Targeting-Konstrukt aus py wurde Standard-ES-Zell-Protokollen folgend in der 4. Passage in Kultur genommen und verbreitert. Die durch Cre-Rekombinaseexpression vermittelte Exzision der gefloxten Doppelselektionskassette im Myf5-*Knock-in*-Lokus wurde *in vitro* durchgeführt. Für die Elektroporation des Expressionsplasmids pMC-Cre in ES Zellen wurden zwei verschiedene Protokolle des Elektroporator Herstellers verfolgt.

Die Zellen wurden direkt nach der Elektroporation in der Elektroporationsküvette für 10 min. auf Eis gestellt. Eine Hälfte des Low Voltage Ansatzes wurde verworfen, die andere Hälfte wie auch den High Voltage Ansatz auf 3 Schalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausplattiert. Die Zellen wurden nach einem Standard ES-Zell-Protokoll inkubiert und dem Medium die Selektionsdroge FIAU in einer Konzentration von 0,25 µM beigemengt. Nach 8 Tagen überlebten nur Klone die keine Doppelselektionskassette im Myf5-*Knock-in*-Lokus aufwiesen. Sie wurden verbreitert und ein Alliquot kryokonserviert. Aus den verbleibenden Zellen wurde DNS isoliert und genotypisiert.

	Low-Voltage Protokoll	High Voltage Protokoll
Schlitzbreite der Küvette:	4 mm (625 V/cm)	2 mm
Spannung (eingestellt):	250 V	500 V
Spannung (im Experiment):	228 V	501 V
Pulslänge (eingestellt):	1,0 ms	100 μs
Pulslänge (im Experiment):	1,5 ms	99 μs
Probenvolumen:	800 µl	400 µl
Zellanzahl:	$1,3.10^7$ Zellen/ml	$1,3.10^7$ Zellen/ml
DNS-Menge (Plasmid):	25 µg	60 µg

### 5.2.7 Generierung Transgener Mäuse

Um aus den ES-Zellen mit dem Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allel transgene Mäuse zu generieren, wurden die nachfolgenden Schritte nach Hogan *et al.* erfolgreich durchgeführt (Hogan *et al.*, 1994).

- Gewinnung von Blastozysten
- Injektion von ES-Zellen in Blastozysten
- Embryotransfer in pseudoträchtige Mäuse
- Identifizierung von Chimären und Etablierung einer Mauslinie

Die für die Generierung der Myf5<sup>FGFki/wt</sup>Mauslinie verwendete ES-Zelllinie 29.32 ohne Doppelselektionskassette im *Knock-in*-Allel stammt von Markus Köster.

# 5.2.8 Genotypisierung

Mittels Schwanzenspitzenbiopsie wurde wie unter 5.2.2 beschrieben DNS von zu genotypisierenden Tieren isoliert und nach restriktionsenzymatischer Hydrolyse in einem 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNS wurde mittels alkalischem Kapillarblot auf eine Polyamidmembran übertragen und mit radioaktiv markierten DNS-Fragmenten hybridisiert (Southern E.M., 1975; Ausubel *et al*, 1992). Die DNS-Sonden wurden mittels Multiprime-Protokoll radioaktiv markiert, nach dem radioaktives [γ-<sup>32</sup>P] dCTP in die Sonde eingebaut wird (Feinberg and Vogelstein, 1983). Die nicht in die Sonde inkorporierten Nukleotide wurden mittels NAP-5<sup>™</sup> Chromatographiesäulen abgetrennt und die Aktivität auf 3 bis 5 Millionen cpm (counts per minute) in Church&Gilbert-Puffer eingestellt.

### 5.2.8.1 Genotypisierung auf mdx und Dystrophin

Die Genotypisierung von Mdx-Mäusen auf mdx und Dystrophin wurde wie bei Sicinski beschrieben durchgeführt (Sicinski *et al.* 1989). Es wurde zu diesem Zweck mittels PCR aus der genomischen DNS ein kleiner Bereich amplifiziert und das Produkt einer Elekrophorese unterzogen. Die DNS wurde mittels alkalischem Kapillarblot auf eine Polyamidmembran übertragen, und mittels radioaktiv markierter Oligonukleotide detektiert, ob die Tiere für das Dystrophingen noch ein Wildtypallel aufweisen. Die Oligonukleotide wurden mit T4-Polynukleotidkinase 5'-seitig radioaktiv markiert. Als Donator des radioaktiven Phosphatrests wird [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP verwendet. Nicht umgesetztes [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP wurde mittels NAP-5<sup>TM</sup> Chromatographiesäulen abgetrennt.

### 5.2.9 Adenovirenpräparation

Die Methoden für die Anzucht, Reinigung/Aufkonzentrierung und Titerbestimmung der Adenoviren vom Subtyp Adv5 wurden dem Methodenbuch "Methods in Cell Biology, Vol. 52" Kapitel 11 "Adenoviral Gene Delivery" Seiten 229 bis 260 entnommen. Die Dichte der verwendeten CsCl-Lösungen wurde mit einem Isopyknometer ermittelt. Abweichend von den Protokollen wurde jedoch ein maximaler Titer von 10<sup>5</sup> iu/ml für Adv5-Cre und 10<sup>6</sup> iu/ml für Adv5-LacZ nach einer Dichtegradientenzentrifugation mittels cpe ermittelt. Die Viruspräparation wurde nach der Aufkonzentrierung mittels Nap5<sup>™</sup>-Säulen von verunreinigendem ClCl getrennt.

#### 5.2.9.1 Injektion von Adenoviren

Die Mäuse wurden vor der Injektion mit Adenoviren gewogen und mit dem Narkotikum Avertin betäubt. C57/Bl6-Mäuse wurden mit Adv-LacZ infiziert, um erste Erfahrungen mit der Applikation zu sammeln. Infizierte Areale konnten dann auf Gewebsschnitten mittels LacZ-Färbung sichtbar gemacht werden.

Tiere der Reportermauslinie Pln13 wurden mit Adv5-Cre infiziert. Diese Tiere tragen als Transgen ein LacZ-Gen mit einem gefloxten Stop-Kodon direkt zwischen Promotor und β-Galactosidase-cDNS. Der Ort der Cre-Aktivität kann anschließend mittels LacZ-Färbung auf Gewebeschnitten sichtbar gemacht werden. Das Fell der betäubten Mäuse wurde auf Höhe der Wade geöffnet, um die Injektion gezielt und reproduzierbar setzen zu können. Für die Injektion wurden 100 µl Adv5 pro Maus eingesetzt. Diese wurden in jeweils 3 verschiedene Positionen der Wade injiziert, da die Virussuspension ansonsten aus der Injektionsstelle austrat. 3 Tage nach Injektion wurden die Gewebe entnommen und in 4% PFA in PBS bei 4°C fixiert. Fast alle Organe wurden den LacZ-Assays zugeführt, um eine mögliche systemische Infektion aufzuzeigen.

# 5.2.10 Elektronenmikroskopische Untersuchung

# 5.2.10.1 Gewinnung und Einbettung der Gewebeproben

Für die Elektronenmikroskopie bestimmte Gewebe müssen sehr schnell und mit geringer mechanischer Kraft präpariert werden, damit möglichst keine Artefakte durch die Präparation entstehen. Um die drei freipräparierten Muskeln Quadriceps, Latissimus und Masseter in kleine Würfel von 1 mm Kantenlänge zu schneiden, wurden feinste Rasierklingen verwendet. Direkt nach der Präparation wurden die Gewebeproben für 2 Stunden in 3% Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer bei RT fixiert und anschließend 6 mal 10 min. in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer gewaschen.

- 1 h 1% Osmiumtetroxid in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer
- 3 mal 10 min. in H<sub>2</sub>O waschen
- je 30 min. in 10%, 30%, und 50% EtOH entwässern
- 1 h 1% Uranylacetat in 70% EtOH
- Lagerung in 70% EtOH mittelfristig möglich
- je 30 min. in 70%, 90%, 100% und 100% EtOH entwässern
- 3 h Infiltration mit Epoxidharz; EtOH : SPURR = 3:1
- 4 h Infiltration mit Epoxidharz; EtOH : SPURR = 1:1
- ÜN Infiltration mit Epoxidharz; EtOH : SPURR = 1:3
- 2 mal 8 h reines SPURR, welches anschließend polymerisiert wird.

Nach Durchführung der vorangegangenen Arbeitsschritte, konnten die Epoxidharzblöcke getrimmt und am Ultramicrotom geschnitten werden. Die kleinen Schnitte wurden anschließend auf vorbereitete Kupfergitter aufgetragen.

### 5.2.10.2 Bestimmung von Satellitenzellen am Elektronenmikroskop

Die Kupfergitter mit den Ultradünnschnitten der fixierten und kontrastierten Gewebe wurden unter dem dem Elektronenmikroskop auf die Anzahl von Satellitenzellen und Myotubenkernen untersucht. Es wurden nur Zellen gezählt, die eindeutig den im Ergebnisteil unter 6.1.9 aufgeführten Kriterien entsprachen. Erythrozyten, Leukozyten, Endothel- und Nervenzellen wurden zusätzlich zu den Skelettmuskelkernen auf den Schnitten beobachtet. Da Ultradünnschnitte nicht der Reihenfolge entsprechend auf den Kupfergittern aufgetragen werden können, wurden möglicherweise einige Areale mehrfach untersucht und ausgezählt.

### 5.2.11 Dekalzifizierung von knochenhaltigen Geweben

Da im Knochengewebe enthaltene Phosphatkristalle die Mikrotomklingen beim Schneiden zerstören, wurden knochenhaltige Gewebe vor dem Schneiden dekalzifiziert und die Knochen enthärtet. Durch eine vierstündige Inkubation in Accumate<sup>™</sup>-Lösung(RDO Rapid decalcifying solution; Sigma Diagnostics ST.Louis, MO, USA) auf dem Schüttler bei RT wurde aus dem Knochengewebe das härtende Kalziumphosphat herausgelöst und die schnittfähige Bindegewebematrix blieben erhalten. Nach diesem Inkubationsschritt wurde das Gewebe 4 mal 5 min. in PBS gewaschen, um Lösungsrückstände zu entfernen und anschließend direkt den Einbettungsprotokollen zuzuführen.

### 5.2.12 Histochemie

#### 5.2.12.1 Einbettung mit dem Ziel von Kryotomdünnschnitten

Gewebe embryonaler und adulter Herkunft sowie vollständige Mausembryonen wurden zwecks Erstellung von Dünnschnitten mit dem Kryomikrotom mit 4% Paraformallehyd in PBS fixiert und in Polyfreeze<sup>™</sup> eingebettet. Die Gewebe und Embryonen wurden direkt nach der Gewebsentnahme bzw. Präparation 2 bis 4 mal in PBS gewaschen und anschließend über Nacht in 4%-iger Paraformaldehyd/PBS-Lösung unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Einwegeinbettungsformen wurden mit Polyfreeze<sup>™</sup> gefüllt und auf Trockeneis gegeben, damit sich eine Bodenplatte aus festem Polyfreeze<sup>™</sup> bildet und das Gewebe anschließend im noch flüssigen Einbettungsmedium plaziert und orientiert werden kann. Ist das Polyfreeze<sup>™</sup> völlig zum Block gefroren, so wird das Gewebe luftdicht in Plastikbeutel verpackt und bei -20°C gelagert. Die Gewebe wurden so bald als möglich im Kryotom mit 8 bis 20 µm Schnittdicke geschnitten. Anschließend wurden die Gewebeschnitte auf beschichtete Objektträger aufgetragen und mindestens 30 min. bei RT getrocknet. Die Schnitttemperatur wurde in Abhängigkeit vom Fettgehalt der Gewebe variiert. Fetthaltigere Gewebe wurden mit einer Kammertemperatur bis zu -28°C geschnitten. Die Muskelgewebeschnitte wurden bei -22°C erstellt.

# 5.2.12.2 Z/AP-Färbung

Die LacZ-Färbung wurde bei histochemischen Untersuchungen an Z/AP-Mäusen als erstes durchgeführt, da die Färbeprotokolle für Alkalische Phosphatasen mit einem Hitzeinaktivierungsschritt bei 65°C beginnen und somit die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität beeinträchtigt würde (Ausubel *et al.*, 1992).

Die Alkalische Phosphatase wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden nachgewiesen. Die Anfärbung mittels nach Herstellerangaben gelöster Fast Red<sup>™</sup> Tabletten (Boehringer Mannheim) führte häufig zu starker Hintergrundaktivität. Als weiteres Nachweissystem wurde die Alkalische Phosphatase einem Protokoll des Fekete Labors (Fekete *et al.*, 1994) folgend mit BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) und NBT (4-Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid) bei RT angefärbt.

# 5.2.12.3 Färbung von Bindegewebe nach Weigert/van Gieson

Das Protokoll für die Färbung von Bindegeweben wurde einer Methodendatenbank im Internet entnommen. Es handelt sich hierbei um eine Hämotoxylinfärbung, die von einer Färbung nach van Gieson gefolgt wird. Die Objektträger müssen nach dem letzten Waschschritt in destilliertem Wasser völlig trocken sein, bevor sie in 100% EtOH geschwenkt werden. Die Objektträger wurden nach der Färbung mit dem Schnelleindeckmittel Entellan<sup>™</sup> eingedeckelt. Der Link zum Protokoll lautet:

http://www.bris.ac.uk/Depts/PathAndMicro/CPL/hvg.html

### 5.2.12.4 Trichromefärbung

Die für den Muskelregenerationsassay verwendete Trichromefärbung wurde direkt nach den Angaben des Kit-Herstellers durchgeführt. Die Objektträger wurden im Vorfeld deparafiniert, in abfallender Ethanolreihe rehydriert und 6 bis 8 mal in destilliertem Wasser gewaschen. Direkt im Anschluß an die Färbung wurden die Objektträger trocken gewischt und die Gewebeschnitte mit dem Schnelleinbettmittel Entellan<sup>®</sup> unter Deckgläser eingedeckelt. Zum Trocknen und zur weiteren Lagerung wurden die fertigen Objekte in der Dunkelheit gelagert.

### 5.2.12.5 Anfärbung von Knorpelsubstanzen

Um etwaige Fehlbildungen im Knochenbau - wie bei der Myf5<sup>m1/m1</sup>Mutante die fehlenden Rippen sichtbar zu machen - wurden in enthäuteten Mäusen Knorpel und Knochen spezifisch angefärbt und anschließend das verbleibende Gewebe geklärt (McLeod *et al.*, 1980).

Die Tiere wurden getötet, enthäutet und 5 Tage in 96% EtOH fixiert. 2 Tage lang wurde das Gewebe in Aceton entfettet und für 2 Tage in der frisch erstellten Färbelösung inkubiert, um anschließend mit destilliertem Wasser überschüssige Färbelösung abzuwaschen. Die Klärung der gefärbten Gewebe wurde für 48 h in 1% KOH durchgeführt und anschließend jede Woche die Klärungslösung gegen eine im Gegensatz zur vorherigen mit einem um 20% erhöhten Glycerinanteil ausgetauscht. Die völlig klarsichtigen Mäuse wurden in 100% Glyzerol aufgenommen und können so unter Lichtausschluß langfristig gelagert werden. Nur Knochen- und Knorpelstrukturen sind noch sichtbar und können somit eingehender untersucht werden. Knochengewebe werden rot dargestellt, knorpelige Strukturen erschein blau.

Färbelösung:

- 1 ml Alizarin Rot 0,1% in 70% EtOH
- 1 ml Alcian Blau 0,3% in 70% EtOH
- 1 ml Essigsäure
- 17 ml EtOH 70%-ig

# 5.2.12.6 Immunhistochemische Anfärbungen

Ziel dieser Inkubation ist die Detektion bestimmter Proteine anhand ihrer spezifischen und einzigartigen Epitope. Parafinschnitte wurden zuvor deparafiniert und rehydriert, Kryoschnitte wurden aufgetaut sowie bei RT getrocknet.

- 4 mal in PBS waschen
- Primär-AK auf die Schnitte geben
- Waschen
- Sekundär-AK Inkubation
- Waschen Detektion
- 1. Einbetten in Entellan<sup>®</sup> im Falle von Parafinschnitten
- 2. Einbettung von Kryoschnitten in Glyzerin

# 5.2.12.7 Whole mount Immunhistochemie

Die Embryonen wurden zu den gewünschten Stadien in DMEM (Dulbecco Minimal Eagle Medium) präpariert und extraembryonales Gewebe entfernt. Das nachfolgende Protokoll ist eine modifizierte Version der Methoden von Dent *et al.* and LeMotte *et al.*, (Dent *et al.*, 1989; LeMotte *et al.*, 1989).

- Fixierung ÜN in Methanol:DMSO = 4:1 bei  $4^{\circ}$ C.
- Bleichen für 5 bis 10 h in frischem Methanol:DMSO:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 4:1:1, anschließend in 1 ml 100% Methanol überführen und bei -20°C lagern.
- Rehydrieren in 1 ml 50% Methanol für 30 min unter leichtem Schütteln.
- Rehydrieren in 1 ml PBS für 30 min. unter leichtem Schütteln.
- 2 mal 1 h 1 ml PBSMT unter leichtem Schütteln.
- ÜN Inkubation mit 1 ml 1:200 verdünntem Primärantikörper MY32 in PBSMT bei 4°C unter leichtem Schütteln.
- 2 mal 1 h waschen in 1 ml PBSMT bei 4°C unter leichtem Schütteln.
- 3 mal 1 h waschen in 10 ml PBSMT bei RT unter leichtem Schütteln.
- ÜN Inkubation mit 1 ml 1:500 verdünntem Sekundärantikörper in PBSMT bei 4°C unter leichtem Schütteln.
- 2 mal 1 h waschen in 1 ml PBSMT bei 4°C unter leichtem Schütteln.
- 3 mal 1 h waschen in 10 ml PBSMT bei RT unter leichtem Schütteln.
- 2 mal waschen in PBT. 1. in 5 ml; 2. in 1 ml für 20 min.
- Inkubation in 1 ml frischer DAB/NiCl<sub>2</sub>-Lösung in PBT (30 mg/50 ml DAB; 30 mg/50 ml NiCl<sub>2</sub>) für 30 min. bei RT unter leichtem Schütteln.
- Zugabe von 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bis die Farbintensität den gewünschten Wert angenommen hat. (In der Regel 2 bis 10 min.)
- Spülen in 1 ml PBT.
- 30 min. Waschen in 1 ml PBT unter leichtem Schütteln bei RT.

- 30 min. Waschen in 1 ml 50% Methanol unter leichtem Schütteln bei RT.
- 30 min. Waschen in 1 ml 80% Methanol unter leichtem Schütteln bei RT.
- 30 min. Waschen in 1 ml 100% Methanol unter leichtem Schütteln bei RT.
- Die Embryonen werden für 10 min. in 500µl BABB überführt und können anschließend in einer Petrischale aus Glas untersucht werden.

PBSMT:

- 200 ml PBS
- 4 g Trockenmilchpulver
- 1 ml Triton X-100

PBT:

- 50 ml PBS
- 1 ml BSA c = 1 mg/ml
- 250 µl Triton X-100

# DAB/NiCl<sub>2</sub>:

- 1 Tablette (10 mg) DAB auf 17 ml PBT
- 127 μl 8% NiCl<sub>2</sub>

# 5.2.13 Whole Mount *in situ* Hybridisierung

Einem Protokoll aus dem Labor Schughart (Schughart; 1997) folgend wurden Embryonen in 4% PFA in PBS über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurden sie gewaschen und in steigender Methanolreihe (25%, 50%, 75% und 2 mal 100%) je 10 min. auf Eis dehydriert. Es wurde dann im Anschluß an die Genotypisierung mittels aus den Eihüllen isolierter DNS ohne eine Abweichung dem Protokoll folgend verfahren. Als RNS-Polymerasen wurden Enzyme der Firma Promega<sup>®</sup> verwendet. Die Hybridisierung fand wegen der höheren Stringenz bei 70°C statt. Anschließend wurden die Embryonen fotografiert und in Gelatine/Albumin eingebettet. Im Anschluß an die Erstellung von Schnitten am Vibratom, wurden letztere in Glycerol eingedeckelt und fotografiert.

# 5.2.14 *In vivo* Induktion des Mx-Promotors

Um *in vivo* den Mx-Promotor in der Mx-Cre-Mauslinie zu aktivieren, muß dieser von Extern angesprochen werden. Der Mx-Promotor des Mx-Cre-Transgens liegt auch als endogener Promotor des Immunsystems vor. Er wird im Falle einer Virusinfektion aktiv. Durch interperitoneale Injektion von doppelsträngiger synthetischer RNS (pIpC) wird eine Virusinvasion simuliert und der Mx-Promotor wird aktiv (Kühn R. *et al.;* 1995). Die Mäuse werden direkt vor Versuchsbeginn gewogen und 15  $\mu$ l pIpC-Lösung/g<sub>Lebendgewicht</sub> appliziert. Diese Prozedur wird zwei mal nach jeweils 2 Tagen wiederholt.

### 5.2.15 Muskelregenerationsassay

Die Regenerationsfähigkeit von Skelettmuskulatur kann aufgezeigt werden, in dem gezielt Verletzungen in der Muskulatur induziert und nach einer Regenerationsphase untersucht werden. Die Wadenmuskulatur von adulten Tieren im Alter von 6 bis 8 Monaten wurde mit flüssigem Stickstoff vereist. Hierzu wird eine Pinzette in Stickstoff getaucht und anschließend die Muskulatur durch das geöffnete Fell 2 bis 3 Sekunden festgehalten. Die Tiere wurden vorher ihrem Körpergewicht entsprechend mit Avertin<sup>®</sup> (15 µl/g<sub>Lebendgewicht</sub>) anästhesiert. Der Schnitt im Fell wurde anschließend geklammert, damit keine Infektionen das Versuchsergebnis verfälschen. Zu den Zeitpunkten 4, 7 und 20 Tage nach Vereisung wurden Tiere getötet, die Wadenmuskulatur entnommen und für Parafinschnitte entsprechend vorbereitet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Muskulatur von Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäusen als Wildtypkontrolle verwendet. Bis auf zwei in den Myf5-Lokus eingeführte loxP-Sequenzen und eine zusätzliche BamHI-Restriktionsschnittstelle entsprechen diese Tiere Wildtypen. Der mögliche Einfluß auf die Genexpression wird als vernachlässigbar gering eingestuft, und birgt den Vorteil, dass diese Tiere den gleichen gemischten Stammhintergrund aufwiesen, wie die MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>- und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäuse. Ein unterschiedlicher Stammhintergrund der mutanten Mauslinien hätte das Versuchsergebnis mitunter stark verzerren können, da die Regenerationsfähigkeit von Stamm zu Stamm unterschiedlich ausfallen kann. Die Skelettmuskulatur in der Wildtypsituation ist 20 Tage nach Vereisung weitgehend rekonstituiert. Bis auf die Anwesenheit einiger zentralständiger Myotubenkerne und einen etwas verringerten Myotubendurchmesser ist die regenerierte Skelettmuskulatur histologisch und funktional unauffällig.

# 6 Ergebnisse

### 6.1 Die Funktion des Myf5 Gens in der Maus

### 6.1.1 Die Klonierung des Myf5-Zielvektors

Die Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mauslinie wurde von Markus Köster etabliert (Köster M., 1999). Die Klonierungsschritte, die zum Generieren des gefloxten Myf5-Lokus geführt haben, sollen hier beschrieben werden, da sie dem eingehenden Verständnis der vorliegenden Arbeit dienen.

In Abb. 7A ist der Zielvektor mit 3 in den Myf5 Lokus inserierten loxP-Erkennungssequenzen (grüne Dreiecke) sowie einer in blau dargestellten Doppelselektionskassette zu sehen. Die Selektionskassette ist von 2 loxP-Sequenzen flankiert, um sie später *in vitro* aus dem Lokus zu entfernen. Sie vermittelt eine starke ubiquitäre Expression von Neomyzinresistenz und Thymidinkinase. Die vom Phosphoglukokinase-Promotor getriebene Neomyzinresistenz (PGK:neo) dient der Positivselektion in Gegenwart von Geneticin G-418 (McBurney *et al.*, 1991). Die kodierende Sequenz der Thymidinkinase wird vom Herpes-Simplex-Virus-Promotor getrieben (HSV:tk) und dient der Negativselektion in Anwesenheit des Substrats FIAU, um zu einem späteren Zeitpunkt auf ihre Abwesenheit hin zu selektionieren (Thomas und Carpecchi, 1987). Die Translationsstartstellen und die Translationsrichtung sind in Abbildung 7A als Pfeile eingezeichnet. Die Transkriptionsorientierung ist entgegen der vom Myf5- bzw. vom benachbarten MRF4-Gen gewählt.

In Abbildung 7B ist die genomische Situation des MRF4/Myf5-Genclusters im Wildtyp dargestellt. Die Gene der beiden myogenen bHLH-Transkritionsfaktoren MRF4 und Myf5 liegen 6 kb auseinander und weisen die gleiche Transkriptionsrichtung auf. Mittels Elektroporation wurde das Zielkonstrukt in *J1*-ES-Zellen transfiziert. Der mutagenisierte Myf5-Lokus wies nach erfolgreicher homologer Rekombination mit dem Zielvektor eine einzelne stromaufwärts gelegene loxP-Sequenz und die gefloxte Doppelselektionskassette auf (Abb. 7C). Durch die Selektionsdroge G-418 wurden alle nicht transfizierten Zellen *in vitro* abgetötet. Die überlebenden Klone wurden aliquotiert und eine Hälfte eingefroren. Aus dem verbleibenden Aliquot wurde DNS isoliert und mittels Southernblot Analyse auf Anwesenheit der Insertion genotypisiert (Abb. 7F). In Bahn 2 und 3 sind die Blots von positiven ES-Zellklonen zu sehen, Bahn 1 zeigt die Wildtypsituation des Myf5-Lokus.



Abb. 7: Mutagenese des Myf5-Lokus mit dem Ziel der konditionalen Inaktivierbarkeit. A: Vektor mit 3 in den Myf5-Lokus inserierten loxP-Sequenzen (in grün) sowie einer Doppelselektionskassette (blau). B: Genomischer MRF4/Myf5 Gencluster. C: Mutagenisierter Myf5-Lokus nach homologer Rekombination mit dem in A dargestellten Vektor. D: Fertig generierter Mvf5<sup>loxP</sup>Lokus nach Entfernung der Doppelselektionskassette. E: Durch Cre-Rekombinase in vivo deletiertes Myf5<sup>ΔloxP</sup>Allel. F: Southernblotanalyse genomischer BamHI gespaltener DNS aus embryonalen Stammzellen (Bahn 1 bis 7) bzw. juvenilen Mäusen (Bahn 8 bis 10). Die

verwendete Probe 1 (Bahn 1 bis 4) und Probe 2 (Bahn 5 bis 10) sowie die detektierten DNS-Restriktionsfragmente sind in B bis E unter den genomischen Karten angegeben. Bahn 1: Wildtyp. Bahn 2, 3: In den Myf5-Lokus inseriertes Zielkonstrukt (siehe C). Bahn 4: Nach Exzision der Doppelselektionskassette (12 kb), (Myf5<sup>loxP</sup>). Bahn 5: Wildtyp-DNS. Bahn 6 und 10: Myf5<sup>loxP</sup>Allel, Bahn 7: 3 kb Bande einer Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Maus (siehe D). Bahn 8: Deletiertes Myf5<sup>ΔloxP</sup>Allel (11 kb Bande). Bahn 9: Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Embryo (11 kb Bande). Restriktionsschnittstellen: A, AfIII; B, BamHI; E, EcoRI; L, BgIII; S, ScaI (Nach Köster M., 1999).

Die Selektionskassette ist von 2 loxP-Sequenzen flankiert, um sie *in vitro* aus dem Lokus zu entfernen. Die Exzision der Selektionskassette ist notwendig, da die Insertion letzterer einen erheblichen Einfluß auf die Architektur des Myf5-Lokus nimmt. Eine Beeinträchtigung der Expression im neuen Myf5-Allel sollte auf jeden Fall ausgeschlossen werden, da die der Wildtypsituation entsprechende Myf5-Expression für eine normale Rippenbildung unerläßlich schien. Die Exzision der Doppelselektionskassette war ein vorrangiges Ziel, um lebensfähige und fruchtbare Mäuse mit einem von loxP-Sequenzen flankierten Myf5-Lokus zu generieren. Durch transiente Transfektion mit dem Cre-Rekombinase-Expressionsvektor pMC-Cre wurde die Doppelselektionskassette erfolgreich *in vitro* aus dem Myf5-Lokus entfernt. Mit dem Nukleotidanalog FIAU im Zellkulturmedium wurde auf die Abwesenheit der PGK-Neo:HSV-Tk-Kassette im Myf5-Lokus selektioniert. Die einzigen Unterschiede des neuen Myf5-Allels zum Wildtyplokus sind die beiden zusätzlich inserierten loxP-Erkennungssequenzen und eine weitere BamHI-Schnittstelle.

Aus den ES-Zellen mit dem modifizierten Myf5-Lokus wurde mittels Blastocysteninjektion und sukzessivem Transfer in scheinschwangere F1-Mäuse chimäre Mäuse erzeugt. Die durch die Agoutianteile in der Fellfarbe als Chimären identifizierten männlichen Tiere wurden anschließend mit C57/bl6-Weibchen verpaart, um im Falle einer Keimbahntransmission für das loxP-flankierte Myf5-Allel heterozygote Myf5<sup>loxP/wt</sup>Nachkommen zu erhalten (Abb. 7F: Bahn 4, 6 und 10). Tiere dieser F1-Generation wurden dann durch Inzucht zur Homozygotie gekreuzt (Abb. 7F: Bahn 7; Tab.: 1). Die erhaltenen Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse der F2-Generation dienten der durch die Cre-Rekombinase vermittelten Exzision des Myf5 Lokus *in vivo*. Durch Cre-Rekombinaseexpression *in vivo* konnte das gefloxte Myf5-Allel deletiert werden (Abb. 7E; 7F: Bahn 8 und 9). Das resultierende Allel ist ein Myf5-Nullallel, da das für alle funktionalen Domänen kodierende erste Exon sowie 2 kb stromaufwärts gelegene den Basalpromotor und weitere regulatorische Elemente enthaltende Sequenzen fehlen. Dieses Allel wird im folgenden mit Myf5<sup>AloxP</sup> bezeichnet.

Myf5 <sup>loxP/wt</sup> x Myf5 <sup>loxP/wt</sup>	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup>	10 (12,5)	8 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup>	25 (25)	23 (25)
Myf5 <sup>wt/wt</sup>	19 (12,5)	15 (12,5)
	]	N = 104 Tiere

**Tab. 1:** Prozentuale Verteilung der aus der Verpaarung  $Myf5^{loxP/wt} \times Myf5^{loxP/wt}$  hervorgegangenen Genotypen. Die erwartete statistische Wahrscheinlichkeit ist in Klammern angegben (N = Summe der Tiere).

# 6.1.2 Die konditionale Inaktivierung des Myf5 Gens

# 6.1.2.1 Rekombination des Myf5<sup>loxP</sup>Allels mittels Mx-Promotor

Die induzierbare Aktivierung des Mx-Promotors stellt eine attraktive Option für die Steuerung der durch Cre-Rekombinase vermittelten Exzision gefloxter DNS-Bereiche dar. Durch Injektion des Induktors pIpC, einer synthetisch hergestellten doppelsträngigen RNS, kann der Zeitpunkt des Rekombinationsereignisses frei gewählt werden. Die RNS Injektion simuliert eine Virusinfektion in deren Folge Interferon freigesetzt wird. Nach erfolgreicher Induktion wird durch den Interferon-responsiven Mx-Promotor die Cre-Rekombinase exprimert. Die Inaktivierung der Myf5-Expression durch Exzision des gefloxten DNS-Abschnitts sollte im Rahmen dieser Arbeit in zwei voneinander abweichenden Konstellationen verfolgt werden.

- (1) Die Rekombination des Myf5-Lokus in adulten Tieren, mit dem Ziel den Einfluß des akuten Verlusts der Myf5-Expression in bis dahin f
  ür das Myf5-Gen positiver Muskulatur aufzuzeigen.
- (2) Die erfolgreiche Exzision des gefloxten Myf5<sup>loxP</sup>Allels in embryonalen Geweben, sollte durch Induktion der Cre-Rekombinaseexpression in trächtigen Weibchen etabliert werden. Die Inaktivierung des Myf5-Lokus während der Embryogenese sollte erreicht werden. Nach erfolgreicher Induktion des Rippenblastems durch das Myf5-Protein, sollte in Embryonen nach dem Entwicklungsstadium E 10,0 *p.c.* das Myf5-Allel inaktiviert werden, damit ab diesem Zeitpunkt die Myogenese ohne den Einfluß des Myf5-Proteins verläuft. Das Ziel dieses Ansatzes war die Generierung lebensfähiger Myf5-defizienter Mäuse, um den Einfluß des fehlenden Transkriptionsfaktors Myf5 auf die Myogenese in postnatalen Stadien untersuchen zu können. Das vorläufige Ziel war die Detektion des rekombinierten, sowie des unrekombinierten Myf5-Lokus in gewebsspezifischen genomischen DNS-Präparationen.

Homozygote Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse wurden mit Mx-Cre<sup>+/-</sup>Mäusen verpaart, um in der F2-Generation die für diesen Versuch benötigten Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:Mx-Cre<sup>+/-</sup>Doppelmutanten zu erhalten (Tab. 2A). Die Tiere der doppelt heterozygoten F1-Generation wurden mit Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäusen verpaart, um Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:Mx-Cre<sup>+/-</sup>Mäuse zu erhalten (Tab. 2B und 2C). 23% bzw. 30 % der Nachkommen wiesen den erwarteten Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:Mx-Cre<sup>+/-</sup> Genotyp auf. Tiere der Linien Myf5<sup>loxP/loxP</sup> und Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:Mx-Cre<sup>+/-</sup> wurden verpaart, um mehr Tiere des Genotyps Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:Mx-Cre<sup>+/-</sup> zu erhalten (Tab. 2E und 2F). Diese Mäuse waren lebensfähig und fertil und wiesen einen unaufällig ausgebildeten Brustkorb auf. Dies schien darauf hinzuweisen, dass der Mx-Promotor während der Embryogenese nicht unspezifisch aktiviert wurde, und somit keine Beeinträchtigung der Rippenbildung durch Myf5defiziente Zellen stattfand. In 8 Monate alten Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:Mx-Cre<sup>+/-</sup>Mäusen wurde durch dreimalige pIpC-Injektion der Mx-Promotor stimuliert. Im Anschluß an eine Gewebsentnahme wurde die DNS unterschiedlicher Muskelgruppen gewonnen und zur Bestimmung der Rekombinationseffizienz einer Southernblot-Analyse unterzogen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Α		
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> x Mx-Cre <sup>+/-</sup>	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup>	23 (12,5)	19 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :Mx-Cre <sup>-/-</sup>	8 (12,5)	19 (12,5)
Myf5 <sup>wt/wt</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup>	8 (12,5)	8 (12,5)
Myf5 <sup>wt/wt</sup> :Mx-Cre <sup>-/-</sup>	3 (12,5)	12 (12,5)
	]	N = 40 Tiere

В

n

D		
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> x Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup>	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup>	17 (12,5)	5 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :Mx-Cre <sup>-/-</sup>	9 (12,5)	17 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup>	13 (12,5)	13 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :Mx-Cre <sup>-/-</sup>	17 (12,5)	9 (12,5)
		N = 22 Tioro

D		
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> x	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup>		
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup>	33 (25)	0 (25)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :Mx-Cre <sup>-/-</sup>	67 (25)	0 (25)
		N = 9 Tiere

C		
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup> x Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup>	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup> /Mx-Cre <sup>+/+</sup>	23 (18,75)	7 (18,75)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :Mx-Cre <sup>-/-</sup>	17 (6,25)	0 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup> /Mx-Cre <sup>+/+</sup>	23 (18,75)	3 (18,75)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :Mx-Cre <sup>-/-</sup>	27 (6,25)	0 (6,25)

N = 30 Tiere

L		
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup> x	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup>		
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :Mx-Cre <sup>+/-</sup>	13 (25)	32 (25)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :Mx-Cre <sup>-/-</sup>	10 (25)	45 (25)

N = 31 Tiere

**Tab. 2:** Prozentuale Verteilung der erhaltenen Genotypen aus den angegebenen Verpaarungen A: Myf5<sup>loxP/wt</sup> x Mx-Cre<sup>+/-</sup>; B: Myf5<sup>loxP/loxP</sup> x Myf5<sup>loxP/wt</sup>:Mx-Cre<sup>+/-</sup>; C: Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:Mx-Cre<sup>+/-</sup> x Myf5<sup>loxP/wt</sup>:Mx-Cre<sup>+/-</sup>; D: Myf5<sup>loxP/loxP</sup> x Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:Mx-Cre<sup>+/-</sup>; E: Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:Mx-Cre<sup>+/-</sup> x Myf5<sup>loxP/loxP</sup>. Die erwartete statistische Wahrscheinlichkeit ist in Klammern angegeben (N = Summe der Tiere).

Die vom Mx-Promotor vermittelte Cre-Rekombinaseexpression war in der Skelettmuskulatur nicht ausreichend gewesen, um den gefloxten Bereich im Myf5-Lokus effizient zu rekombinieren. Diese vorläufigen Ergebnisse hatten zur Folge, dass diese Strategie der Myf5-Rekombination durch das Mx-Cre-Allel nicht weiter verfolgt wurde. Ein weiterer Versuch die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5-Gens während der Embryonalentwicklung zu induzieren wurde verworfen, da die Erfolgaussichten dieses Ansatzes durch die an den adulten Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:Mx-Cre<sup>+/-</sup>Mäusen gesammelten Erfahrungen in Frage gestellt wurden.

#### 6.1.2.2 Die gewebsspezifische Exzision mittels MCK-Cre Mauslinie

Die muskelspezifische Inaktivierung des Myf5-Gens war eine weiterer Ansatz, um die Letalität von Myf5-*Knock-out* Mäuse zu umgehen. Das Ziel war es das Myf5-Gen zu inaktivieren, nachdem die Induktion des Rippenblastems abgeschlossen ist. Die Kondensation des Rippenblastems kann ab dem Stadium E 14,0 *post coitum* beobachtet werden. Der die Cre-Rekombinaseexpression treibende Promotor sollte nach diesem Zeitpunkt der Embryogenese aktiv werden.

Eine geeignete Mauslinie zum Zweck der muskelspezifischen Myf5-Exzision wurde von Jens C. Brüning beschrieben (Brüning *et al.;* 1998). Die MCK-Cre-Maus weist ein Transgen mit einem 6,5 kb großen Bereich des Muskel-Creatin-Kinase Promotors auf, der die Expression einer Cre-Rekombinase-cDNS mit Kernlokalisationssequenz treibt. Die Rekombinase wird somit im Anschluß an die Translation in den Kern transportiert, wo sie sich in erhöhter Konzentration anreichert. Die vom MCK-Promotor vermittelte Cre-Rekombinaseexpression deletiert mehr als 95% der gefloxten DNS-Bereiche in der Skelettmuskulatur und 92% im Herzen ohne in anderen Geweben aktiv zu sein (Brüning *et al.;* 1998).

Der MCK-Promotor wird in der Maus ab Tag E 15,0 *p.c.* aktiv, dem Zeitpunkt des ersten Auftretens sekundärer Myotuben (Lyons *et al.;* 1991). Für die Ratte wurde beschrieben, dass die Promotoraktivität schnell ansteigt und sie ihr Maximum wenige Tage nach der Geburt erreicht, um dann lebenslänglich einem konstant hohen Niveau exprimiert zu werden (Trask and Billadello, 1990). Überträgt man diese Daten auf die Maus, so scheint der MCK-Promotor sehr geeignet, um das Myf5-Gen ausreichend spät in der Embryogenese zu inaktivieren. Das Rippenblastem sollte wie in der Wildtypsituation durch frühe myotomale Myf5-Expression induziert werden. Die Determinierung von Muskelvorläuferzellen sollte in diesen Mäusen wie im Wildtyp verlaufen. Die Muskelvorläuferzellen würden, im Rahmen der Embryogenese nach dem Entwicklungsstadium E 15,0 *p.c.*, durch die vom MCK-Promotor vermittelte Cre-Expression zu Myf5-Nullmutanten. Die Untersuchung der Funktion des Myf5-Gens in Myogenese und Regeneration sollte zum ersten Mal in lebenden Myf5-defizienten Mäusen möglich sein. Die Effizienz der vom MCK-Cre-Allel ausgehenden Rekombination gefloxter DNS wurde untersucht, um sicher zu stellen, dass die MCK-Cre-Mauslinie geeignet war, die auf Skelettmuskulatur beschränkte Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Allels

zu vermitteln. Anschließend wurden MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse generiert, um lebensfähige Mäuse mit Myf5-defizienter Skelettmuskulatur zu erhalten.

#### 6.1.2.3 Das Expressionsmusters des MCK-Promotors

Das zeitliche und räumliche Expressionsmuster der vom MCK-Promotor vermittelten Cre-Expression wurde untersucht, um die Eignung der MCK-Cre-Mauslinie aufzuzeigen. Zu diesem Zweck wurde die vom Cre-Enzym verursachte Rekombination mit Hilfe einer Reportermauslinie charakterisiert. Das von der MCK-Cre-Mauslinie vermittelte Cre-Rekombinaseexpressionsmuster wurde durch Einkreuzen der Z/AP-Reportermauslinie aufgezeigt. In dieser Reportermauslinie wird durch den CAGG-Promotor eine annähernd ubiquitäre LacZ-Expression vermittelt (Abb. 8) (Niwa et al.; 1991). Der CAGG-Promotor besteht aus einem Cyto-Megalie-Virus-Enhancer gefolgt von einem Hühnchen-B-Aktin-Promotor. Die β-Galaktosidaseaktiviät wird durch eine βgeo-Kassette vermittelt (Friedrich and Soriano, 1991). Es handelt sich hierbei um die Fusion einer LacZ-Sequenz mit der Sequenz für eine Neomycinresistenz. Die βgeo-Kassette weist im 3'-Bereich 3 PolyA-Signale auf, damit eine unbeabsichtigte Translation eines weiter stromabwärts gelegenen Gens (hPLAP) durch den starken Fusionspromotor unterbleibt. Die ßgeo-Kassette ist von loxP-Erkennungssequenzen flankiert und kann durch Cre-Rekombinase-Expression deletiert werden. Die cDNS einer humanen plazentalen alkalischen Phosphatase (hPLAP) ist direkt stromabwärts hinter die zweite loxP-Erkennungssequenz kloniert und wird im Falle einer Deletion der ßgeo-Kassette in den Leseraster des CAGG-Promotors rekombiniert. Eine von der Cre-Rekombinase erfolgreich vermittelte Rekombination konnte somit histochemisch aufgezeigt werden. Unrekombinierte Zellen und Gewebe sind LacZ-positiv. Rekombinierte Areale sind hingegen β-Galactosidase-negativ und exprimieren die alkalische Phosphatase, welche ebenfalls durch histochemische Methoden nachgewiesen werden kann.

#### 6.1.2.4 Die vom Z/AP-Allel vermittelte Reportergenexpression

Die für Z/AP<sup>+/-</sup>Mäuse beschriebene annähernd ubiquitäre LacZ-Expression wurde zuerst überprüft. Für das Z/AP-Allel heterozygote Embryos des Entwicklungsstadiums E 17,75 *p.c.* wurden präpariert, eingebettet und auf den anschließend hergestellten Kryoschnitten wurde die LacZ-Expression nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Anfärbung sind in Abb. 8 zusammengefaßt.





Abb. 8: LacZ-Färbung von Kryoschnitten eines Z/AP<sup>+/-</sup> Mausembryos des Stadiums E 17,75 *p.c.*. Obere Reihe: Armmuskulatur: M. Trapezius oder M. Bizeps. Unten links: Gewebe wie braunes Fett, Knochen oder aber subkutanes Bindegewebe bleiben LacZ-negativ. Unten rechts: die Mus-

kulatur zwischen den Rippen zeigt ebenfalls eine intensive LacZ-Anfärbung, die Rippe rechts im Bild hingegen bleibt farblos. Alle Skelettmuskeln in der Maus sowie die Epidermis und Haarfollikel sind LacZ-positiv.

Die gesamte Skelettmuskulatur der Z/AP<sup>+/-</sup>Mausembryos weist eine starke LacZ-Anfärbung auf. Exemplarisch sind Armmuskeln von M. Trapezius oder M. Bizeps (Abb. 8 obere Reihe) und Interkostalmuskulatur dargestellt (Abb. 8 untere Reihe). Die Epidermis und Haarfollikel sind ebenfalls durch ihre intensive LacZ-Färbung klar identifizierbar. Andere innere Organe, wie Herz, Lunge, Leber und Nieren weisen eine schwächere LacZ-Aktivität auf und beinhalten zusätzlich auch LacZ-negative Zellen. Gewebe wie braunes Fett, Knochen und subkutanes Bindegewebe von Z/AP<sup>+/-</sup>Embryos bleiben auch nach mehrtägiger Inkubation in Färbelösung LacZ-negativ (Ergebnis nicht gezeigt).

Als nächstes wurde die Farbreaktion auf Alkalische Phosphatase (AP) an Z/AP<sup>+/-</sup>Embryos getestet. Mit dem Ziel die endogenen Alkalischen Phosphatasen zu inaktivieren, wurden die Gewebeschnitte hitzeinaktiviert. Nach 10 minutiger Inkubation bei 65°C und anschließender Färbung auf AP-positive Zellen blieben die Schnitte völlig farblos. Es war anschließend nicht möglich AP-Expression zu detektieren (Ergebnis nicht gezeigt). Das Z/AP-Allel vermittelt im unrekombinierten Fall keine ungewünschte Expression der hitzestabilen humanen plazentalen alkalischen Phosphatase. Die Z/AP-Reportermaus ist geeignet die durch Cre-Rekombinase vermittelte Exzision der LacZ-Kassette zu detektieren.

### 6.1.2.5 Die Rekombination in Z/AP-Reportermäusen durch MCK-Cre

Die vom MCK-Promotor vermittelte Cre-Rekombinase-Expression wird in diesem Abschnitt dargestellt. Unrekombinierte Bereiche erschienen durch LacZ-Anfärbung blau gefärbt. Während der Stadien E 15,75 bis E 17,75 *p.c.* wurden Myotuben im Anschluss an eine erfolgreiche Rekombination in unterschiedlichem Ausmaß violett gefärbt (Abb. 9). Die blaue LacZ-Färbung wird in diesem Fall von der einsetzenden roten Fast-Red-Anfärbung überlagert, da das  $\beta$ -Galaktosidase-Protein noch bis zu 48 Stunden aktiv sein kann. Ein intermediärer Farbton wurde durch gleichzeitige rote und blaue Färbung erzielt.



**Abb. 9:** Mit einem Kryotom erstellte Schnitte von Skelettmuskulatur aus MCK-Cre<sup>+/-</sup> :Z/AP<sup>+/-</sup>Embryonen des Stadiums E 17,75 *p.c.*. Durch MCK-Cre-Aktivität rekombinierte Myotuben sind rot angefärbt, nicht rekombiniertes Gewebe ist blau. AP- und LacZ-Färbung.

Durch die histochemische Analyse von MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Z/AP<sup>+/-</sup>Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien konnte gezeigt werden, dass die Cre-Rekombinase durch den MCK-Promotor muskelspezifisch exprimiert wird. Wie Abbildung 9 rechts oben zu sehen sind in einigen Muskeln um das Stadium E 17,75 *p.c.* die gefloxten Bereiche nahezu vollständig rekombiniert. Das räumliche und zeitliche Expressionsmuster des MCK-Cre-Allels entspricht der für den endogenen MCK-Promotor beschriebenen Aktivität. Die Cre-Rekombinaseexpression durch das MCK-Cre-Transgen stellte sich als geeignet heraus, das Myf5<sup>loxP</sup>Allel nach erfolgreicher Rippeninduktion jedoch zeitlich vor der Geburt zu rekombinieren.

**6.1.2.6 MCK-Cre-Allel vermittelte Rekombination des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus** Mit dem Ziel MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse zu generieren, wurden homozygote Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse mit heterozygoten MCK-Cre<sup>+/-</sup>Mäusen gekreuzt (Tab. 3A). Die Hälfte der Nachkommen dieser Verpaarung war doppelt heterozygot. MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/wt</sup>Tiere der F1-Generation wurden mit Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäusen verpaart, um in der F2-Generation MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse zu erhalten (Tab. 3B). Alle Tiere der F2-Generation waren lebensfähig und wiesen keine sichtbaren Auffälligkeiten auf. Die Genotypisierung 3 Wochen alter Tiere führte zur Identifizierung von MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäusen, die der Statistik entsprechend 25% eines Wurfes ausmachten. Die MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse zeigten auch zu späteren Stadien keine Auffälligkeiten ihrer Körperhaltung oder ihrer Bewegungen. MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern mit den Genotypen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern mit den Genotypen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern mit den Genotypen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern mit den Genotypen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern mit den Genotypen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern mit den Genotypen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern mit den Genotypen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern mit den Genotypen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern mit den Genotypen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern mit den Genotypen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern mit den Genotypen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern Mit den Genotypen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse sind nicht von ihren Geschwistern Mit den Myf5<sup>loxP/wt</sup>:MCK-Cre<sup>+/-</sup> und der Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:MCK-Cre<sup>+/-</sup>Mauslinie verpaart (Tab. 3C und 3D).



Abb. 10: Gewebsspezifische Southernblotanalyse einer 9,5 Wochen alten MCK-Cre<sup>+/-</sup> :Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Maus. 1: gesamte Unterarmmuskulatur; 2: Musculus Biceps Brachi (zweiköpfiger Oberarmbeuger); 3:

Musculus Latissimus Dorsi (breiter Rückenmuskel); 4: Musculus Erector Spinae und Musculus Longissimus Thoracis (tiefe Rückenmuskeln) 5: Diaphragma (Zwerchfell); 6: Musculus Trapezoides (Trapezmuskel des Rückens); 7: Musculus Quadriceps (vierköpfiger Oberschenkelbeuger); 8: Musculus Soleus und Musculus Gastrocnemius (Wadenmuskulatur); 9: Musculus Pectoralis Major (großer Brustmuskel); 10: Musculus Masseter (Kaumuskel); 11: Zungenmuskel; 12: Musculus Obliquus Ext. Abdominis (Bauchwand); 14: Herz; 15: Lunge; 16: Milz. Bis zu 30% der gefloxten DNS wurden durch Cre-Rekombinase vermittelt aus dem Myf5-Lokus geschnitten. Die genomische DNS wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten. Die Myf5-Allele wurden mit der in Abb. 7D beschriebenen Probe 2 detektiert. Die Cre-Rekombinase wurde mit der gesamten cDNS als Sonde detektiert.

Aus Skelettmuskulatur, Herz, Lunge und Milz 9,5 Wochen alter MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup> Mäuse, wurde DNS gewonnen und einer Southernblot-Analyse unterzogen (Abb. 10). In bis zu 30% der Muskelzellen wurde die gefloxte DNS durch die Cre-Rekombinase aus dem Myf5-Lokus geschnitten. So wurde z.B. in den Proben aus dem Arm (Bahn 1 und 2) und dem Kaumuskel (Bahn 10), aber auch dem Herz (Bahn 14) eine hohe Effizienz der Rekombination beobachtet. Die DNS aus Lunge und Milz (Bahn 15 und 16) wies eine schwache fast unsichtbare Bande auf Höhe des Myf5<sup>∆loxP</sup>Allels (11 kb) auf, die durch Hintergrundaktivität des MCK-Cre-Transgens verursacht wird.

В

MCK-Cre <sup>+/-</sup> x Myf5 <sup>loxP/loxP</sup>	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	19 (25)	33 (25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	19 (25)	29 (25)
	]	N = 21 Tiere

А

С		
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup> x	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>I0XP/I0XP</sup>		
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	50 (12,5)	8 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	0 (12,5)	18 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	8 (12,5)	8 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	8 (12,5)	0 (12,5)
		N = 12 Tiere

Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup> x	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>		
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MCK-Cre <sup>+/+</sup>	1 (3,125)	0 (3,125)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	11 (6,25)	9 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	0 (3,125)	4 (3,125)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MCK-Cre <sup>+/+</sup>	0 (6,25)	0 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	14 (12,5)	19 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	11 (6,25)	8 (6,25)
Myf5 <sup>wt/wt</sup> :MCK-Cre <sup>+/+</sup>	0 (3,125)	0 (3,125)
Myf5 <sup>wt/wt</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	8 (6,25)	2 (6,25)
Myf5 <sup>wt/wt</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	8 (3,125)	5 (3,125)
	]	N = 91 Tiere

D		
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup> x Myf5 <sup>loxP/loxP</sup>	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	100 (25)	0 (25)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	0 (25)	0 (25)
		N = 7 Tiere

**Tab. 3:** Prozentuale Verteilung der erhaltenen Genotypen aus den angegebenen Verpaarungen A: MCK-Cre<sup>+/-</sup> x Myf5<sup>loxP/loxP</sup>; B: Myf5<sup>loxP/wt</sup>:MCK-Cre<sup>+/-</sup> x Myf5<sup>loxP/wt</sup>:MCK-Cre<sup>+/-</sup>; C: Myf5<sup>loxP/wt</sup>:MCK-Cre<sup>+/-</sup> x Myf5<sup>loxP/loxP</sup>; D: Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:MCK-Cre<sup>+/-</sup> x Myf5<sup>loxP/loxP</sup>. Die erwartete statistische Wahrscheinlichkeit ist in Klammern angegeben (N = Anzahl der Tiere).

### 6.1.2.7 Der Einfluß von MyoD auf die MCK-Cre-vermittelte Exzision

Die vorangegangene Beobachtung, dass häufig weniger als 30% der gefloxten Myf5-Allele durch das MCK-Cre-Allel rekombiniert wurden, führte zu der Annahme, dass möglicherweise die DNS des Myf5-Lokus stark kondensiert wird (Gerber *et al.*, 1997). In MyoD<sup>-/-</sup> Mäusen ist die Myogenese in verstärktem Maße von der Myf5-Expression abhängig, da MyoD als Muskelvorläuferzellen determinierender Faktor nicht vorhanden ist. Wenn die Inaktivierung des Myf5-Lokus ein in der Wildtypmyogenese wichtiger Vorgang wäre, dann würde diese in MyoD<sup>-/-</sup>Mäusen unmöglich, da Myf5 die Funktion des MyoD-Gens kompensatorisch übernehmen würde. Der Myf5-Lokus könnte in MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:MyoD<sup>-/-</sup> Dreifachmutanten während der Embryogenese nicht auf der Chromatinebene durch Kondensation oder Methylierung inaktiviert werden, und sollte somit für die muskelspezifisch exprimierte Cre-Rekombinase ein zugängliches Substrat darstellen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden MCK-Cre+-: Myf5loxP/loxP: MyoD--Dreifachmutanten generiert. Im Vorfeld wurden Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten mit MyoD<sup>-/-</sup>Mäusen gekreuzt. Die doppeltheterozygoten MyoD<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/wt</sup>Mutanten der F1-Generation wurden mit homozygoten Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten verpaart, mit dem Ziel MyoD<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten zu generieren. Die MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten wurden anschließend mit den zuvor generierten MyoD<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten gekreuzt (Tab. 4B und 4D). Die resultierende F2-Generation war zu 33% für alle drei Allele heterozygot (MCK-Cre<sup>+/-</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/wt</sup> Die aus der Verpaarung hervorgegangenen MCK-Cre<sup>+/-</sup>:MyoD<sup>+/-</sup> 4B). Tab. :Mvf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten der F2-Generation wurden untereinander verpaart (Tab. 4C), um für MyoD und Myf5 doppelthomozygote Mutanten zu erhalten (Tab. 4C). Erschwerend für das Auftreten des gewünschten Genotyps ist die Beobachtung, dass homozygote MvoD-/-Neugeborene während des Säugens einen Entwicklungsnachteil gegenüber ihren heterozygoten Geschwistern haben, und deshalb mit einer Rate unterhalb der statistischen Wahrscheinlichkeit überleben. Die statistische Wahrscheinlichkeit MyoD<sup>-/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten mit mindestens einem MCK-Cre-Allel zu generieren beträgt 18,75%. Die Neugeborenen wurden in ihren ersten Lebenstagen beobachtet und 4 Tage nach der Geburt eine DNS-Präparation verschiedener Gewebe durchgeführt. Die Tiere wurden mittels Schwanzspitzenbiopsie genotypisiert und eine Southernblotanalyse mit den DNS-Proben verschiedener Gewebe durchgeführt (Abb. 11).



Abb. 11: Der Einfluß von MyoD auf die MCK-Cre-vermittelte Exzision des gefloxten Myf5-Allels. Southernblotanalyse genomischer BamHI gespaltener DNS mit der in Abb. 7D beschriebenen Probe 2 sowie der Cre-RekombinasecDNS als Sonden. Es ist kein

Einfluß von MyoD auf die Rekombination von Myf5 ersichtlich. Die untersuchten Tiere waren 4 Tage alt. Qu: Oberschenkelbeuger; Bw: Bauchwand; Lat. Breiter Rückenmuskel; Tri: Oberarmstrecker; He: Herz; Ic: Rippengewebe und Rippenmuskulatur; Ta: Schwanz. Der in den Southernblots beobachtete Rekombinationsgrad des Myf5<sup>loxP</sup>Allels war in MCK-Cre<sup>+/-</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten und MCK-Cre<sup>+/-</sup>:MyoD<sup>+/+</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten in allen Geweben vergleichbar. Die Abwesenheit des MyoD-Proteins in den MCK-Cre<sup>+/-</sup>: MyoD<sup>-/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten hatte keinen Einfluß auf die MCK-Cre<sup>+/-</sup>-vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Allels.

B

A	
1 .	

Mvf5 <sup>loxP/loxP</sup> MCK-Cre <sup>+/-</sup> :MvoD <sup>-/-</sup> x	Tiere
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> MCK-Cre <sup>+/-</sup> ·MyoD <sup>+/-</sup>	
myis mer ere myob	
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>-/-</sup> MCK-Cre <sup>+/-</sup>	25 (37,5)
/MCK-Cre <sup>+/+</sup>	
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>-/-</sup> MCK-Cre <sup>-/-</sup>	12,5 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> MCK-Cre <sup>+/-</sup>	37,5 (37,5)
/MCK-Cre <sup>+/+</sup>	
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> MCK-Cre <sup>-/-</sup>	25 (12,5)
	N = 8 Tiere

Myf5 <sup>loxP/wt</sup> ·MyoD <sup>-/-</sup> x	Tiere
NG CSIONP/IONP NGW C +/-	11010
Myf5 <sup>1011</sup> MCK-Cre	
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> ·MyoD <sup>+/-</sup> MCK-Cre <sup>+/-</sup>	22 (25)
WIYID WICK-CIC	22 (23)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> ·MyoD <sup>+/-</sup> MCK Cre <sup>-/-</sup>	45 (25)
WIYIS .WIYOD WICK-CIE	43 (23)
Mvf5 <sup>loxP/wt</sup> :MvoD <sup>+/-</sup> MCK-Cre <sup>+/-</sup>	33 (25)
ingite ingod interfere	55 ( )
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> MCK-Cre <sup>-/-</sup>	0 (25)
	N = 0 Time
	N = 9 Here

С

Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup> x Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>-/-</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup> /MCK-Cre <sup>+/+</sup>	2 (9,375)	1 (9,375)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>-/-</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	3 (3,125)	0 (3,125)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup> /MCK-Cre <sup>+/+</sup>	20 (18,75)	7 (18,75)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	8 (6,25)	13 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/+</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup> /MCK-Cre <sup>+/+</sup>	12 (9,375)	12 (9,375)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/+</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	10 (3,125)	12 (3,125)
		N = 95 Tiere

••	
17	

95	Tiere

Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> x Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	18 (6,25)	34 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	8 (6,25)	8 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/+</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	8 (6,25)	8 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/+</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	8 (6,25)	8 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	0 (6,25)	0 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	0 (6,25)	0 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/+</sup> :MCK-Cre <sup>+/-</sup>	0 (6,25)	0 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/+</sup> :MCK-Cre <sup>-/-</sup>	0 (6,25)	0 (6,25)

N = 12 Tiere

Tab. 4: Prozentuale Verteilung der erhaltenen Genotypen aus den angegebenen Verpaarungen A: MCK-Cre<sup>+/-</sup> x Myf5<sup>loxP/loxP</sup>; B: Myf5<sup>loxP/wt</sup>:MCK-Cre<sup>+/-</sup> x Myf5<sup>loxP/wt</sup>:MCK-Cre<sup>+/-</sup>; C: Myf5<sup>loxP/wt</sup>:MCK-Cre<sup>+/-</sup> x Myf5<sup>loxP/loxP</sup>; D: Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:MCK-Cre<sup>+/-</sup> x Myf5<sup>loxP/loxP</sup>. Die erwartete statistische Wahrscheinlichkeit ist in Klammern angegeben. (N = Anzahl der Tiere).

# 6.1.2.8 Die Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Allels mittels Adv5-Cre

Die räumliche und zeitliche Kontrolle der Geninaktivierung wurde durch Cre-Rekombinase exprimierende Adenovirus-Vektoren vermittelt (Wang *et al.;* 1996a). Adenovirus-Vektoren sind geeignet die Cre-Rekombinaseexpression zu vermitteln, da sie in der Lage sind postmitotische Gewebe wie die Skelettmuskulatur erfolgreich zu infizieren. Da die verwendeten Adenovirusvektoren nicht replikationskompetent waren, vermittelten sie eine lokale Infektion, die sich nicht weiter ausbreiten konnte. Die durch die Vektoren vermittelte Cre-Rekombinaseexpression sollte ausschließlich auf die Skelettmuskulatur begrenzt sein, um das Verhalten Myf5-defizienter Skelettmuskulatur in einer *de facto* Wildtypumgebung eingehend untersuchen zu können.



Abb.:12: LacZ-Anfärbung nach Injektion von Adv5-LacZ in die Wade. Abbildung A und B zeigen die Injektionsstellen in der Wade. In Abbildungen C und D sind vom Virus infizierte Bereiche des Peritoneums zu sehen.

Die durch Adenoviren vermittelte *in vivo* Infektion von Muskelgewebe wurde zunächst mit einem LacZ-exprimierenden Adenovirus durchgeführt, um die Wege der Infektion und ihrer räumlichen Verbreitung sichtbar zu machen. In den Abbildungen 12A und 12B sind die Injektionsstellen in der Wade einer Maus nach LacZ-Färbung dargestellt. Die Infektionsherde sind lokal stark begrenzt und weisen eine intensive LacZ-Färbung auf. Jedoch hat die Immunantwort gegen die Viren einen Großteil des infizierten Muskelgewebes lysiert und hinterläßt große Löcher in der Skelettmuskulatur. In anderen von der Injektionsstelle weit entfernte Geweben der Maus kam es zu weiteren Infektionen durch den Adenovirusvektor. Die Leber und die Nieren waren vollständig infiziert, wohingegen die Körperwand klar begrenzte Infektionsherde aufwies (Abb. 12C und 12D). Andere Gewebe wie das Gehirn (Abb. 13C) waren nach der Adv5-LacZ-Injektion vollständig LacZ-negativ, was sich durch die Blut-Hirnschranke begründet.

Weitere Vorversuche wurden mit dem die Cre-Rekombinase exprimierenden Vektor Adv5-Cre in Pln13 LacZ-Reportermäusen durchgeführt. Die von Adv5-Cre erfolgreich infizierten Gewebe, wurden durch die Cre-Rekombinaseexpression vermittelt LacZ-positiv. Ein gefloxtes Stop-Kodon im 5'-Bereich des LacZ-Transgens der Pln13-Reportermäuse wurde durch die Cre-Rekombinase entfernt und somit die LacZ-Expression ermöglicht. Auch hier konnte wieder eine systemische Infektion beobachtet werden. Das Gefäßendothel der infizierten Wade ist flächendeckend LacZ-positiv (Abb. 13A). Nieren und Leber waren nach der Adv5-Cre-Injektion vollständig infiziert. In Abbildung 13B ist der Ausschnitt eines Quadriceps zu sehen, welcher einzelne LacZ-positive Myotuben aufweist. In den meisten Geweben der mit Adv5-Cre infizierten Pln13-Mäuse konnte eine räumlich stark begrenzte LacZ-Färbung detektiert werden. Abweichend vom Vektor Adv5-LacZ wurde für den Adv5-Cre zusätzlich auch eine partielle Infektion der Gefäßendothelien oder der Pia mater des Gehirns detektiert.



13: LacZ-Fär-Abb. bung verschiedener Gewebe nach Adenovirusinjektion in die Wade. A: Eine Gefäßinnenwand in der Wade zeigt eine starke LacZ-Färbung. B: Im Quadriceps detektierte LacZ-Färbung. C: Gehirn nach Infektion mit

Adv5-LacZ. D: LacZ-Färbung im Gehirn nach Infektion mit Adv5-Cre. Die Bilder A, B und D stammen von Pln13-Reportermäusen denen 6 Tage zuvor Adv5-Cre in die Wade injiziert wurde.

# 6.1.3 Die Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>-Allels durch die Cre-deleter-Mauslinie

#### 6.1.3.1 Der Einfluß von MRF-Nullallelen auf die Rippenformation

In diesem Abschnitt werden Mäuse beschrieben, in denen das vormals gefloxte Myf5<sup>loxP</sup>Allel in allen Zellen deletiert wurde. Diese Tiere sollten die Funktionalität der durch Cre-Rekombinase-Expression vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>-Allels aufzeigen. Cre-deleter Mäuse wurden zu diesem Zweck in die Myf5<sup>loxP</sup>Mauslinie eingekreuzt. Cre-Del<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>ΔloxP</sup>Embryonen sollten eine Phänokopie des zuvor für die Myf5-defizienten Myf5<sup>m1/m1</sup>- bzw. Myf5<sup>nlacZ</sup>-Mutanten beschriebenen Rippenphänotyps (Abb. 16B) darstellen (Myf5<sup>m1</sup>Allel: Braun T. *et al.*, 1992; Myf5<sup>nlacZ</sup>Allel:. Tajbakhsh and Buckingham, 1994). Das verwendete Cre-deleter-Allel vermittelt eine ubiquitäre Cre-Rekombinaseexpression ab dem Zygotenstadium. Das gefloxte Myf5<sup>loxP</sup>Allel des frühen Embryos sollte vor der Implantation in den Uterus zu 100% deletiert sein. Die von der Myf5-Expression abhängige Induktion des Rippenblastems könnte nicht stattfinden, da Cre-Del<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Embryonen schon kurze Zeit nach der Befruchtung Myf5-Nullmutanten wären.

Um Cre-Del<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Embryonen mit ihren Myf5-Nullallelen zu generieren, wurde die Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mauslinie mit einer Cre-deleter-Linie gekreuzt (Tab. 5A). Die Verpaarung von doppelt heterozygoten F1-Mäusen untereinander (Tab. 5D), sowie die Verpaarung von Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäusen mit Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:Cre-Del<sup>+/-</sup>Mutanten hätte 25% Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>: Cre-Del<sup>+/-</sup>Embryonen ergeben sollen, denen distale Rippen fehlen (Tab. 5C und 5F). Tatsächlich wurden keine Embryonen mit Mißbildungen des Brustkorbs detektiert, wenn sie durch Kaiserschnitt am Tag E 18,5 *p.c.* entnommen wurden. Die Verpaarung von Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:Cre-Del<sup>+/-</sup> und Myf5<sup>ΔloxP/loxP</sup>Tieren führte zum gleichen Ergebnis (Tab. 5B und 5E). Alle Tiere hatten zu diesem Zeitpunkt einen unauffällig ausgebildeten Brustkorb und fingen selbständig zu Atmen an. Auch die Muskulatur der Neugeborenen erschien makroskopisch unauffällig ausgebildet. Alle Tiere konnten sich bewegen und selbsttätig das Muttertier zum Säugen aufsuchen. Für diese unerwarteten Beobachtungen sind zwei Erklärungsansätze möglich.

- Die Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Embryonen sind keine echten Myf5-Nullmutanten, so dass der Brustkorb durch die noch verbleibende Myf5-Expression nicht rekombinierter Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Zellen angelegt wird.
- (2) Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Embryonen sind Myf5-Nullmutanten, die einen milderen als den bisher beschriebenen Phänotyp aufweisen und einen funktionalen Brustkorb besitzen.

Die Anfärbung von Skelettstrukturen genotypisierter Embryonen des Stadiums Tag E 18,5 *p.c.* sollte Aufschluß geben. Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sup> Embryonen weisen einen unauffällig ausgebildeten Brustkorb auf, der nicht von dem des Wildtyps unterschieden werden kann (Abb. 14A und F). Die Abwesenheit von Myf5-Protein in Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sup> Embryonen und die daraus resultierende 1,75-tägige Verspätung der Myotomdeterminierung haben keinen Einfluß auf die Induktion des Rippenblastems und der sich daraus bildenden Rippen (Kaul *et al.;* 2000). Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem neuen Myf5<sup> $\Delta$ loxP</sup> Allel und den bisher beschriebenen Myf5-Nullallelen Myf5<sup>m1</sup> und Myf5<sup>nlacZ</sup> besteht in der im Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sup> Maus zu sehen, deren Brustkorb normal ausgeprägt ist.



Abb. 14: Skelettfärbung von Mausembryonen des Embryonalstadiums E 18.5 p.c.. A: Der normal ausgeprägte Brustkorb des Wildtyps. Die Geno-Mvf5<sup>FGF6ki/FGF6ki</sup>. typen  $Myf5^{\Delta loxP/wt}$ :MRF4<sup>m1/wt</sup> und  $Mvf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$  (C, E und F) führten ebenfalls zu unauffällig ausgeprägten Brustkörben. B: Skelett einer Myf5<sup>m1/m1</sup>Nullmutante abwesendem mit Brustkorb zu sehen. Knochen wurde rot gefärbt, Knorpel wird bläulich dargestellt (Mc-Leod, 1980). (Die Bilder B und D wurden mit freundlicher

Genehmigung von Thomas Braun zur Verfügung gestellt.)

#### A

Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> x Cre-Del <sup>+/-</sup>	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>\Delta loxP/wt</sup> :Cre-Del <sup>+/-</sup>	67 (50)	33 (50)
		1.0

		/	L
N =	12	Tiere	

Weibchen

N = 52 Tiere

#### В

$Myf5^{\Delta loxP/wt}$ :Cre-Del <sup>+/-</sup> x $Myf5^{\Delta loxP/loxP}$	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP:Cre-Del<sup>+/-</sup></sup>	12 (37,5)	11 (37,5)
Myf5 <sup>∆loxP/loxP</sup> :Cre-Del <sup>-/-</sup>	21 (12,5)	6 (12,5)
Myf5 <sup>∆loxP/wt</sup> :Cre-Del <sup>+/-</sup>	6 (25)	13 (25)
Myf5 <sup>∆loxP/wt</sup> :Cre-Del <sup>-/-</sup>	7 (12,5)	6 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :Cre-Del <sup>-/-</sup>	13 (12,5)	5 (12,5)
	]	N = 25 Tiere

D

$\begin{array}{l} Myf5^{\Delta loxP/wt}:Cre-Del^{+/-} \\ Myf5^{\Delta loxP/wt}:Cre-Del^{+/-} \end{array}$	Männchen	Weibchen
$Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$	20 (12,5)	8 (12,5)
Myf5 <sup>∆loxP/wt</sup>	28 (25)	40 (25)
Myf5 <sup>wt/wt</sup>	4 (12,5)	0 (12,5)
	1	N = 25 Tiere

С

Myf5 <sup>210x1</sup> /210x1 :Cre-Del	21 (12,5)	11 (12,5)
Myf5 <sup>\[Delta]</sup> Myf5 <sup>\[Delta]</sup> Scre-Del <sup>-/-</sup>	26 (12,5)	3 (12,5)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/wt</sup> :Cre-Del <sup>+/-</sup>	21 (12,5)	5 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :Cre-Del <sup>-/-</sup>	8 (12,5)	5 (12,5)
	]	N = 38 Tiere
Ε		
$Myf5^{\Delta loxP/loxP} x$	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>\Delta loxP/wt</sup> :Cre-Del <sup>+/-</sup>		
$Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$	25 (37,5)	12 (37,5)
$Myf5^{\Delta loxP/loxP}$	6 (12,5)	4 (12,5)
$Myf5^{\Delta loxP/wt}$	17 (37,5)	25 (37,5)
l D /t		

Männchen

F

Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:Cre-Del<sup>+/-</sup> x Myf5<sup>loxP/loxP</sup>

-				
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/wt</sup> :Cre-Del <sup>+/-</sup> x	$\Delta lox P / \Delta lox P$	$\Delta lox P/lox P$	ΔloxP/wt	loxP/wt
Myf5 <sup>loxr/loxr</sup>	in %	in %	in %	1n %
Е 9,5	23 (25)	25 (25)	27 (25)	25 (25)
E 18,5	22 (25)	26 (25)	30 (25)	17 (25)
1 Monat alt	19 (25)	36 (25)	26 (25)	19 (25)
				N = 242 Tiere

Tab. 5: Prozentuale Verteilung der erhaltenen Genotypen aus den angegebenen Verpaarungen A:  $Myf5^{loxP/loxP} \times Cre-Del^{+/-}$ ; B:  $Myf5^{\Delta loxP/wt}$ : Cre-Del^{+/-}  $\times Myf5^{\Delta loxP/loxP}$ ; C:  $Myf5^{\Delta loxP/wt}$ : Cre-Del^{+/-}  $\times Myf5^{\Delta loxP/wt}$  $\text{Del}^{+/-} \times \text{Myf5}^{\text{loxP/loxP}}$ ; D: Myf5 $^{\text{\Delta loxP/wt}}$ :Cre-Del $^{+/-} \times \text{Myf5}^{\text{\Delta loxP/wt}}$ :Cre-Del $^{+/-}$ ; E: Myf5 $^{\text{\Delta loxP/loxP}} \times \text{Myf5}^{-1}$  $Myf5^{\Delta loxP/wt}$ :Cre-Del<sup>+/-</sup>; F:  $Myf5^{\Delta loxP/wt}$ :Cre-Del<sup>+/-</sup> x  $Myf5^{loxP/loxP}$ . Die erwartete statistische Wahrscheinlichkeit ist in Klammern angegeben (N = Summe der Tiere).

Um diese Ergebnisse weiter zu bestätigen, wurde das Myf6<sup>m1</sup>-Allel in die Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Linie eingekreuzt (Tab. 6). Das Myf6<sup>m1</sup>-Allel unterdrückt die Expression des im MRF4/Myf5-Lokus unmittelbar benachbarten Myf5-Gens in cis (Floss et al.; 1996). Die doppelt heterozygoten Myf5<sup>m1/wt</sup>:Myf6<sup>m1/wt</sup>Mutanten sind folglich Myf5-Nullmutanten. Durch die verspätete Myotominduktion und das gestörte Auswachsen distaler Rippen, wird kein funktionaler Brustkorb in Myf5<sup>m1/wt</sup>:Myf6<sup>m1/wt</sup>Mutanten gebildet (Abb. 14D). Durch Verpaarung von heterozygoten Myf $6^{m1/wt}$ Mäusen mit Myf $5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ Mutanten wurden 50% der F1-Generation als doppeltheterozygote Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:Myf6<sup>m1/wt</sup>Mutanten geboren. Diese Neugeboren unterschieden sich phänotypisch nicht von ihren heterozygoten Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>Geschwistern (Kaul *et al.;* 2000). Die Tiere wiesen einen unauffällig ausgebildeten Brustkorb auf, und fingen nach der Geburt selbständig zu atmen an (Abb. 14E). Sie waren lebensfähig, voll beweglich und wurden wie Wildtypen zwischen der 6. und 8. Lebenswoche geschlechtsreif. Die Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:Myf6<sup>m1/wt</sup> Mutanten sind für das Myf6-Gen heterozygote Myf5-Nullmutanten, die wie Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäuse einen normal ausgebildeten Brustkorb aufweisen.

Myf5 <sup>∆loxP/wt</sup> :Cre-Del <sup>+/-</sup> x MRF4 <sup>wt/-</sup>	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>∆loxP/wt</sup> :MRF4 <sup>wt/-</sup>	14 (12,5)	16 (12,5)
Myf5 <sup>∆loxP/wt</sup> :MRF4 <sup>wt/wt</sup>	24 (12,5)	8 (12,5)
Myf5 <sup>wt/wt</sup> :MRF4 <sup>wt/-</sup>	16 (12,5)	3 (12,5)
Myf5 <sup>wt/wt</sup> :MRF4 <sup>wt/wt</sup>	8 (12,5)	11 (12,5)
		N = 37 Tiere

**Tab. 6:** Anzahl und Verteilung der erhaltenen Genotypen aus der Verpaarung Myf5<sup> $\Delta$ loxP/wt</sup>:Cre-Del<sup>+/-</sup> x MRF4<sup>wt/-</sup>. Die erwartete statistische Wahrscheinlichkeit ist in Klammern angegeben (N = Anzahl der Tiere).

# 6.1.3.2 In Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen werden keine Myf5-Transkripte gebildet

Wie schon in Abbildung 7 gezeigt wurde, fehlen der Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Maus nach erfolgreicher Deletion der von loxP-Erkennungssequenzen flankierten DNS alle funktionalen Domänen des Myf5-Gens auf genomischer Ebene. In Embryonen des Stadiums E 9,5 *p.c.* wurde mittels Southernblotanalyse die vollständige Exzision des von loxP-Sequenzen flankierten DNS-Abschnitts detektiert (Abb. 15 obere Reihe).

In Bahn 1 sind die Wildtypbande und die des unrekombinierten gefloxten Myf5-Allels zu sehen. In Bahn 2 ist ebenfalls die DNS eines heterozygoten Tieres zu sehen, welches zusätzlich das Cre-deleter-Allel trägt. In der dritten und vierten Bahn der Southernblotanalyse sind DNS Bandenmuster von vormals für das Myf5<sup>loxP</sup>Allel homozygoter Embryonen zu sehen. Durch die Verpaarung mit einer Cre-deleter-Mauslinie wurden die von loxP-Erkennungssequenzen flankierten Bereiche aus dem Genom herausrekombinert. Bemerkenswert ist in Bahn 3 die schwache Bande unrekombiniert verbleibender Myf5<sup>loxP</sup>DNS (\*).





**Abb. 15:** Southernblotanalyse BamHI gespaltener genomischer DNS und Whole-mount-*in-situ*-RNS-Hybridisierung mit einer Myf5-spezifischer Sonde in Embryonen des Stadiums E 9,5 *p.c.*. In Bahn 1 ist ein für das Myf5<sup>loxP</sup>Allel heterozygotes Tier zu sehen, dessen korrespondierende Anfärbung ein Myf5-Wildtypexpressionsmuster aufweist (A). In Bahn 2 ist das DNS-Bandenmuster eines für die Myf5<sup>AloxP</sup>Mutation heterozygoten Tieres zu sehen. B: Das Myf5-Expressionsmuster der Wildtypsituation ist bei geringerer Intensität identisch, da nur ein funktionales Myf5-Allel vorhanden ist. In der dritten und vierten Bahn der Southernblotanalyse sind DNS-Bandenmuster von vormals für das Myf5<sup>loxP</sup>Allel homozygoter Tiere zu sehen. Die von loxP-Erkennungssequenzen flankierten Bereiche der Myf5<sup>loxP</sup>Allele wurden aus dem Genom heraus rekombinert. Dieser Vorgang war im Falle des dritten Embryos nicht gänzlich erfolgreich, eine schwache unrekombinierte Myf5<sup>loxP</sup>Allel herrührt. D: Im vierten Embryo fehlt die Myf5-Expression völlig. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Herbert Neuhaus).

Die Untersuchung möglicher Ursachen für die mitunter unzureichende Rekombinationseffizienz der Cre-Rekombinase wird unter 7.2.4 diskutiert. Die in Abb. 15 genotypisierten Embryonen wurden einer Wholemount-*in-situ* RNS Hybridisierung unterzogen, um die Expression des Myf5-Gens im vollständigen sich entwickelnden Organismus darzustellen. Das erste Bild zeigt eine normale Myf5-Expression im Myotom der deepithelialisierenden Somiten und der dorsalen dermomyotomalen Lippe während des Stadiums E 9,5 *p.c.*. Der Embryo ist für das Myf5<sup>loxP</sup>Allel heterozygot. Die inserierten loxP-Sequenzen im Myf5<sup>loxP</sup>Allel haben keinen Einfluss auf das Expressionsmuster des Myf5-Gens. Im folgenden Bild ist die schwächere Myf5-Expression eines für das Myf5<sup>ΔloxP</sup>Allel heterozygoten Tieres zu sehen. Das Myotom ist trotz der geringeren Dosis an Myf5-Transkript vollständig angelegt. Im dritten Bild von Abbildung 15 ist die verbleibende Myf5-Expression eines nicht vollständig rekombinierten Myf5<sup>loxP</sup>Allels noch schwach zu sehen. Die von einer kleinen Zellpopulation mit verbleibendem Myf5<sup>loxP</sup>Allel vermittelte Myf5-Expression entspricht von der räumlichen Verteilung her dem Wildtypexpressionsmuster. Es wird dennoch kein vollwertiges Myotom von normaler Größe angelegt, da die verbleibende Myf5-Restexpression nicht ausreicht, um die benötigte Anzahl von Muskelvorläuferzellen zu determinieren.

Der Transkriptionsfaktor Myf5 wird zellautonom exprimiert und kann somit keinen induktiven Einfluß auf die potentiellen Muskelvorläuferzellen mit deletiertem Myf5<sup>ΔloxP</sup>Allel nehmen. Aus der unvollständigen Deletion der gefloxten DNS und der schwachen myotomalen Myf5-Expression lässt sich ableiten, dass der gesamte Embryo hinsichtlich der Myf5<sup>loxP</sup> und Myf5<sup>ΔloxP</sup>Allele chimär ist und die von der Cre-Rekombinase vermittelte Exzision nicht organ- bzw. gewebsspezifisch unterblieb. Im vierten Bild ist die Abwesenheit jeglicher Myf5<sup>loxP</sup>Allels im Embryo verlief hier vollständig, da weder in der Southernblotanalyse eine verbleibende Myf5<sup>loxP</sup>Bande bei 3 kb sichtbar ist, noch eine eventuelle Myf5-Expression detektiert wurde. Es handelt sich bei dem Myf5<sup>ΔloxP</sup>Allel um ein Myf5-Nullallel. Myf5<sup>ΔloxP</sup>Allele asstellen sollen. Im weiteren sollte die Expression myotomaler Marker untersucht werden, da wie für die Myf5<sup>m1</sup>- und Myf5<sup>nlacZ</sup>Allele beschrieben wurde, die Abwesenheit von Myf5-Protein in der vorläufigen Abwesenheit des frühen Myotoms resultiert.

# 6.1.3.3 Die Expression von Muskelmarkern in Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Mäusen

Als indirekter Nachweis der Myf5-Abwesenheit in Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen wurde das Ausbleiben der vom Myf5-Protein verursachten biologischen Aktivität aufgezeigt. In Abwesenheit des Myf5-Proteins wird das Myotom zunächst nicht angelegt. Folglich unterbleibt auch die Determinierung erster Muskelvorläuferzellen, deren Abwesenheit durch das Fehlen von spezifischen Skelettmuskelmarkern aufgezeigt werden kann. Die mRNS des in Muskelvorläuferzellen direkt vom Transkriptionsfaktor Myf5 aktivierten Myogenin-Gens wurde in ganzen Embryonen des Entwicklungsstadiums E 9,5 *p.c.* mittels Wholemount-*in-situ*-RNS-Hybridisierung nachgewiesen (Abb. 16: A bis C).



Abb. 16: Myotomdetektion mittels Wholemount-in-situ-RNS-Hybridisierung (A bis C) und immunhistochemischer Anfärbung (D bis F) in Mausembryonen des Embryonalstadiums E 9,5 p.c.. Myogenin-antisense-cRNS detektiert die Myogeninexpression im neu gebildeten Myotom. A: Im Myf5<sup>loxP/wt</sup>Embryo wird wie im Myf5<sup> ΔloxP/wt</sup>Embryo (B) das gesamte Myotom angefärbt. C: Im  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}Embryo$  wird keine Myogenin-Expression detektiert.

In den Embryonen in D, E und F wird in frühen Myotuben Myosin-Schwere-Kette mittels MF20-Antikörpern in Somiten und im Herzen nachgewiesen. Die Embryonen D und E zeigen ein myotomales Expressionsmuster, wohingegen der Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Embryo ausschließlich die Expression im Herzen aufweist. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Herbert Neuhaus).

Wildtyp (Abb. 16A) und Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup> (Abb. 16B) Embryonen wiesen das gleiche räumliche Myogenin-Expressionsmuster auf, da in Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>Embryonen die Myf5-Expression des verbleibenden funktionalen Myf5-Allels ausreichte, um die Determinierung von Muskelvorläuferzellen zu vermitteln. Im heterozygoten Embryo war die Myogenin-Expression schwächer, sie erstreckte sich aber über das gleiche Zellareal, wie es im Wildtyp beobachtet wurde. Die Expressionshöhe von Myogenin war folglich direkt dosisabhängig von der in den Muskelvorläuferzellen herrschenden Myf5-Expression. Im Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Embryo (C) war die Myogenin-Expression nicht detektierbar, da durch die Abwesenheit des Myf5-Proteins der Myogeninpromotor nicht aktiviert wurde. In Frontal- (Abb. 17B) und Transversalschnit-
ten (Abb. 17D) ist die Abwesenheit der Myogeninexpression noch detailierter zu sehen. Das Myf5<sup>ΔloxP</sup>Allel führte in der homozygoten Situation zu einer Phänokopie der beschriebenen Myf5<sup>m1</sup>- und Myf5<sup>nlacZ</sup>Allele. In Myf5-defizienten Embryonen wurde in den Somiten kein frühes Myotom angelegt, so dass die Myogeninexpression unterblieb.

Um auszuschließen, dass ein Myotom in Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sup>Embryonen auch ohne Myogeninexpression angelegt wird, wurde Myosin-Schwere-Kette in ganzen Embryonen Entwicklungsstadiums E 9,5 *p.c.* immunhistochemisch detektiert (Abb. 16D bis 16F). Myosin Schwere Kette wird neben anderen muskelspezifischen Strukturproteinen in primären Myotuben exprimiert. Die Myotuben entstehen aus fusionierenden Myoblasten, die ihrerseits das Myotom bilden, bzw. aus ihm hervorgehen. Die einsetzende Myosin Schwere Kette Expression ist in nicht mutanten (Abb. 16D) und Myf5<sup> $\Delta$ loxP</sup>heterozygoten (Abb. 16E) Embryonen auf das Myotom und das Herz beschränkt. In (Abb. 16 F) ist die völlige Abwesenheit von Myosin Schwere Kette Expression im Myotom von Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sup>Embryos zu sehen. Die myotomlosen Somiten des Myf5-defizienten Embryos sind trotz ausbleibender Färbung gut zu erkennen. Die Herzexpression dient als interne Kontrolle für eine erfolgreiche Myosin Schwere Kette Detektion.



**Abb. 17:** Somitomale Myogeninexpression in Embryonen des Entwicklungsstadiums E 9,5 *p.c.*. In A und C sind Wildtypembryos zu sehen. In B und D sind die ausgebliebene Myogenindetektion wie das Fehlen eines Myotoms gut sichtbar. In A und B sind Transversalschnitte nach Whole-mount*in-situ*-Hybridisierung mit einer

Myogeninprobe zu sehen, in C und D handelt es sich um Frontalschnitte.

Die fehlende Myf5-Expression in Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Embryos resultiert in einer Verspätung der Myotomdeterminierung. Myogenin- und MHC- Expression sind in Myf5-defizienten Embryonen des Entwicklungsstadiums E 9,5 *p.c.* nicht nachweisbar. Die ersatzlose Abwesenheit von myotomalen Strukturen in Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sup>Embryos wird in Abbildung 17 deutlich. Im</sup> Wildtypembryo trennt das Myogenin-positive Myotom das epitheliale Dermomyotom vom Sklerotom (Abb. 17A und 17C). Das deepithelialisierte Sklerotom grenzt im  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ Embryo direkt an das Dermomyotom (Abb. 17D).

In den bisher beschriebenen Myf5-Nullmutanten wurde das Ausbleiben von FGF6-Expression im zukünftigen Muskelfeld um das Stadium E 9,5 *p.c.* beobachtet. Das FGF6-Protein wird im Wildtyp von myotomalen Zellen sezerniert. Es wurde angenommen, dass das diffusible FGF6-Protein vom frühen Myotom sekretiert wird, um das benachbarte Sklerotom zu induzieren. Die verzögerte FGF6-Expression wurde als Ursache für den letalen Rippenphänotyp angesehen. Die FGF6-Expression in den Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Embryonen wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Wholemount-*in-situ*-Hybridierung dargestellt.</sup>



**Abb. 18:** Wholemount-*in-situ*-Hybridierung von Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sup>Embryonen mit einer FGF6-Antisense-Probe. Der Embryo in A befindet sich im Embryonalstadium E 10,5 *p.c.*. Die Pfeilspitze zeigt auf die FGF6-Expression innerhalb der epaxialen Domäne, die hypaxiale Domäne ist mit einem Pfeil markiert. In B ist die FGF6-Expression der presumtiven Skelettmuskulatur von Vorder- (Pfeil) und Hinterextremitäten (Pfeilspitze) zu sehen. In B ist das Embryonalstadium E 12,5 *p.c.* dargestellt.

Die FGF6-Expression in den epaxialen und hypaxialen Domänen des Myotoms ist trotz der Abwesenheit der Myf5-Expression in Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Mutanten ab dem Embryonalstadium E10,5 unauffällig (Abb. 18A). Die ab dem Entwicklungsstadium E 9,75 *p.c.* einsetzende MyoD-Expression ruft die FGF6-Expression in den hyaxialen und den epaxialen Muskelvorläuferzellen hervor. In die Extremitäten einwandernde Muskelvorläuferzellen hypaxialer Herkunft kondensieren wie im Wildtyp zu presumptiven Skelettmuskelgruppen. Diese Zellen weisen eine unauffällige FGF6-Expression auf (Abb. 18B).</sup>

### 6.1.4 Die Skelettmuskulatur in MyoD<sup>-/-</sup>:Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Embryonen

Die beiden MRF-Familienmitglieder MyoD und Myf5 sind in die Determinierung des Myotoms involviert. Im Falle einer Nullmutation kann der eine Faktor für den anderen einspringen und vermittelt somit die Determinierung einer ausreichenden Anzahl von Muskelvorläuferzellen. Für den MyoD<sup>-/-</sup>:Myf5<sup>m1/m1</sup>Doppel-*Knock-out* wurde die völlige Abwesenheit von Skelettmuskulatur zum Zeitpunkt der Geburt beschrieben (Rudnicki *et al.;* 1993). Die Ursache liegt im Ausbleiben der Myotomdetermination, so dass keine Muskelvorläuferzellen gebildet werden können.

Um zu prüfen, ob auch durch das neue Myf5-Allel in MyoD-Abwesenheit zum Verlust jeglicher Myogenese führt, oder aber die beobachtete Muskeldefizienz in Myf5<sup>m1/m1</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>-Doppelmutanten ähnlich dem Rippenphänotyp auf einer Fehlregulation weiterer Gene beruht, wurden Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Embryonen generiert. Zu diesem Zweck wurden homozygote MyoD<sup>-/-</sup>Mäuse mit homozygoten Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten verpaart. Die Tiere der resultierenden F1-Generation waren für beide beobachteten Merkmale heterozygot und wurden nach dem Erreichen der Geschlechtsreife mit Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten rückgekreuzt, um Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Mäuse zu generieren. Diese wurden anschließend mit Myf5<sup>ΔloxP/+</sup>:Cre-Del<sup>+/-</sup>Mäusen verpaart (Tab. 7B und 7D). Parallel zu diesem Ansatz wurden Myf5<sup>loxP/+</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Tiere der F1-Generation mit Myf5<sup>ΔloxP/+</sup>:Cre-Del<sup>+/-</sup>Mäusen verpaart (Tab. 7A). Aus dieser Verpaarung ging ein vitales Weibchen mit Genotyp Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup> hervor. Es wurde somit keine Phänokopie der zuvor als letal beschriebenen Myf5<sup>m1/m1</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Mutante generiert. Das Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Weibchen wurde mit einem Myf5<sup>ΔloxP/loxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Männchen verpaart, um die Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Mauslinie zu verbreitern (Tab. 7C). Das Myf5 $^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ : MyoD<sup>+/-</sup>Weibchen war fertil und warf mehrere vitale Tiere mit dem Myf5<sup>\(\Delta lox P/\(\Delta lox P)\)</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Genotyp. Aus den Verpaarungen von Myf5<sup>△loxP/loxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Mutanten untereinander (Tab. 7E) oder aber mit homozygoten MyoD<sup>-</sup> <sup>/-</sup>Mäusen (Tab. 7G) gingen vitale Myf5<sup>△loxP/+</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Tiere hervor. Tiere mit dem Genotyp Myf5<sup>m1/+</sup>:MyoD<sup>-/-</sup> wurden zuvor aufgrund einer reduzierten Skelettmuskelmasse als letal beschrieben.

Das Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>:MyoD<sup>+/-</sup>Weibchen wurde mit einem Myf5<sup> $\Delta$ loxP/loxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Männchen verpaart. Embryonen, die am Tag E 18,5 *p.c.* dem Weibchen durch Kaiserschnitt entnom-</sup>

men wurden, waren bis auf wenige Ausnahmen spontan oder nach externem Reiz bewegungsaktiv. Nachdem die Embryonalhüllen entfernt wurden begannen die Embryonen nach Druck auf den Brustkorb selbständig zu atmen. Lediglich Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>-/-</sup> Doppelnullmutanten zeigten keine spontanen oder induzierten Bewegungen und wiesen eine spannungslose Körperhaltung auf, die in einem runden Rücken resultierte (Abb. 19). Die Haltung der auffallend dünnen Vorderextremitäten war kraftlos und die Vorderpfoten hingen herunter. Die Körperwand war durchscheinend und gab den Blick auf innere Organe und Gefäße frei. Der unauffällig ausgebildete Brustkorb und das Sternum von normaler Länge waren gut sichtbar. Diese Embryonen begannen weder spontan noch nach Reizung zu atmen. Makroskopisch betrachtet schien im blassen Körper der Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>-/-</sup> Embryonen keine Skelettmuskulatur angelegt zu sein. Auf Parafinschnitten dieser Mutanten bestätigte sich dieser erste Eindruck (nicht abgebildet). Die normalerweise aus den Somiten hervorgehende Skelettmuskulatur wurde in den Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Doppelnullmutanten nicht angelegt und fehlte zum Stadium E 18,5 p.c. der Embryogenese völlig. Der Phänotyp der Mvf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MvoD<sup>-/-</sup>Embryonen stellt eine Phänokopie der zuvor beschriebenen Myf5<sup>m1/m1</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Doppelmutante dar. Ausschließlich der zusätzlich durch das Myf5<sup>m1</sup>Allel hervorgerufenen Rippenphänotyp in Myf5<sup>m1/m1</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Embryonen wurde nicht in  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ :  $MyoD^{-/-}Doppelnullmutanten beobachtet.$ 



**Abb. 19:** Mausembryonen am Tag E 18,5 *p.c.*. Der linke Embryo ist Myf5<sup> $\Delta$ loxP/wt</sup>: MyoD<sup>+/-</sup> und zeigt eine normale Körperhaltung, da die gesamte Skelettmuskulatur vollständig angelegt ist. Der rechte Embryo trägt den Genotyp Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>: MyoD-/und weist einen spannungslos</sup>

gebogenen Rücken und eine unnormale Haltung der Vorderextremitäten auf. Da der Embryo völlig frei von Skelettmuskulatur ist, erscheint er transparent und lässt einen Blick auf die inneren Organe zu.

٠
А

1	
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> x	Tiere
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/wt</sup> :Cre-Del <sup>+/-</sup>	
$Myf5^{\Delta lox P/\Delta lox P}$ : $MyoD^{+/-}$	25 (6,25)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP:MyoD<sup>+/+</sup></sup>	50 (6,25)
Myf5 <sup>ΔloxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	0 (6,25)
Myf5 $\Delta loxP/loxP$ :MyoD <sup>+/+</sup>	0 (6,25)
Myf5 $\Delta lox P/wt$ :MyoD <sup>+/-</sup>	25 (18,75)
Myf5 $\Delta loxP/wt$ :MyoD <sup>+/+</sup>	0 (18,75)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	0 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/+</sup>	0 (6,25)
Myf5 <sup>wt/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	0 (12,5)
Myf5 <sup>wt/wt</sup> :MyoD <sup>+/+</sup>	0 (12,5)
	N = 4 Tiere

В		
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> x	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/wt</sup> :Cre-Del <sup>+/-</sup>		
Myf5 <sup>\[D]</sup> MyoD <sup>+/-</sup>	0 (6,25)	18 (6,25)
$Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}:MyoD^{+/+}$	5 (3,125)	14 (3,125)
$Myf5^{\Delta loxP/loxP}$ : $MyoD^{+/-}$	5 (6,25)	23 (6,25)
$Myf5^{\Delta loxP/loxP}$ : $MyoD^{+/+}$	10 (3,125)	10 (3,125)
Myf5 <sup>∆loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	5 (6,25)	5 (6,25)
Myf5 <sup>∆loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/+</sup>	0 (3,125)	0 (3,125)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	0 (6,25)	0 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/+</sup>	0 (3,125)	5 (3,125)
	1	N = 21 Tiere

С

Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> x	Tiere
$Myf5^{\Delta lox P/\Delta lox P}:MyoD^{+/-}$	
Alov D/Alov D /	
Myf5 <sup>Δloxr/Δloxr</sup> :MyoD <sup>-/-</sup>	letal $(12,5)$
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	65 (25)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP</sup> :MyoD <sup>+/+</sup>	22 (12,5)
Myf5 <sup>ΔloxP/loxP</sup> :MyoD <sup>-/-</sup>	0 (12,5)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	9 (25)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/+</sup>	4 (12,5)
	N = 23 Tiere

D		
Myf5 <sup>ΔloxP/wt</sup> :Cre-Del x Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP:MyoD<sup>+/-</sup></sup>	0 (12,5)	11 (12,5)
Myf5 <sup>∆loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	46 (12,5)	11 (12,5)
Myf5 <sup>∆loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	0 (12,5)	0 (12,5)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	32 (12,5)	0 (12,5)

N = 19 Tiere

E

Myf5 <sup>\Delta loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> x	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup>ΔloxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>		
Myf5 <sup>\[D]</sup> MyoD <sup>-/-</sup>	letal (3,125)	letal (3,125)
Myf5 <sup>\Delta loxP/\Delta loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	0 (6,25)	20 (6,25)
$Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}:MyoD^{+/+}$	0 (3,125)	0 (3,125)
Myf5 <sup>\Delta loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>-/-</sup>	10 (6,25)	10 (6,25)
Myf5 <sup>\Delta</sup> loxP/loxP :MyoD <sup>+/-</sup>	10 (12,5)	10 (12,5)
$Myf5^{\Delta loxP/loxP}$ : $MyoD^{+/+}$	0 (6,25)	0 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>-/-</sup>	10 (3,125)	20 (3,125)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	0 (6,25)	0 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/+</sup>	10 (3,125)	0 (3,125)

F

ľ	
Myf5 <sup>ΔloxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> x	Tiere
Myf5 <sup>∆loxP/wt</sup> :Cre-Del <sup>+/-</sup>	
$Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}:MyoD^{+/-}$	43 (18,75)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP</sup> :MyoD <sup>+/+</sup>	14 (18,75)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	0 (18,75)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/+</sup>	28 (18,75)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	14 (6,25)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/loxP</sup> :MyoD <sup>+/+</sup>	0 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	0 (6,25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/+</sup>	0 (6,25)
	N = 7 Tiere

N = 10 Tiere

0	
Myf5 <sup>\(\Delta lox P/lox P)</sup> :MyoD <sup>+/-</sup> x MyoD <sup>-/-</sup>	Tiere
Myf5 <sup>ΔloxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	33 (25)
Myf5 <sup>ΔloxP/wt</sup> :MyoD <sup>-/-</sup>	33 (25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>+/-</sup>	17 (25)
Myf5 <sup>loxP/wt</sup> :MyoD <sup>-/-</sup>	17 (25)
	N = 6 Tiere

**Tab. 7:** Prozentuale Verteilung der erhaltenen Genotypen aus den Verpaarungen A: Myf5<sup>loxP/wt</sup>:MyoD<sup>+/-</sup> x Myf5<sup> $\Delta$ loxP/wt</sup>:Cre-Del<sup>+/-</sup>; B: Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup> x Myf5<sup> $\Delta$ loxP/wt</sup>:Cre-Del<sup>+/-</sup> C: Myf5<sup> $\Delta$ loxP/loxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup> x Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>:MyoD<sup>+/-</sup>; D: Myf5<sup> $\Delta$ loxP/wt</sup>:Cre-Del x Myf5<sup>loxP/loxP</sup>: MyoD<sup>+/-</sup>; E: Myf5<sup> $\Delta$ loxP/loxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup> x Myf5<sup> $\Delta$ loxP/loxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>; F: Myf5<sup> $\Delta$ loxP/loxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup> x Myf5<sup> $\Delta$ loxP/wt</sup>:Cre-Del<sup>+/-</sup>; G: Myf5<sup> $\Delta$ loxP/loxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup> x MyoD<sup>-/-</sup>. (N = Anzahl der Tiere)</sup>

# 6.1.5 Der klinische Phänotyp adulter Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäuse

## 6.1.5.1 Die auffällige Bewegungsweise adulter Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäuse

Zum Ende der Embryogese und die erste Zeit nach der Geburt zeigen  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ Mutanten keine klinischen Auffälligkeiten. Mit zunehmendem Alter weisen die  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ Tiere Unterschiede zu ihren heterozygoten Wurfgenossen und Wildtypmäusen auf. Der Schwanz von  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ Tieren ist dünn und fast gänzlich immobil, die Körpergröße der Mutanten ist hingegen normal. Ab einem Alter von ungefähr 2 Monaten werden Veränderungen in der Körperhaltung sichtbar. Die Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}Mutanten entwickeln eine Kyphose und einen wackeligen Gang.

### 6.1.5.2 Der Habitus von adulten Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Tieren

Mit einem Alter von 4 Monaten wiesen 97% der Weibchen und 67% der Männchen einen auffälligen Gang auf (Tab. 8). 37% der männlichen Tiere und 3% der Weibchen wiesen trotz Homozygotie für das Myf5<sup>ΔloxP</sup>Allel einen normalen Gang auf. Eine geringfügige Beeinträchtigung der Beweglichkeit wurde bei 24% der Weibchen beobachtet, wohingegen ein leicht kriechender Gang für männliche Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Tiere nie beobachtet wurde.

	Normaler Gang	schwächlicher kriechender Gang	
		Moderater Verlauf	Schwerer Verlauf
Männchen	37 %	0 %	67 %
Weibchen	3%	24 %	73 %
			N = 70 Tiere

**Tab. 8:** Die statistische Verteilung des auffälligen Ganges bei Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Mäusen nach Geschlecht getrennt. Alle Tiere waren älter als 4 Monate, da sich die Bewegungsauffälligkeiten bis dahin ausgeprägt hatten.

Der sich mit der Zeit verschlechternde auffällige Gang begann mit leicht wackligen Bewegungen der Hinterläufe während des Gehens. Mit zunehmender Verschlechterung der Beweglichkeit waren die Mäuse nicht mehr in der Lage ihre Körper vom Boden zu heben (Abb. 20C und 20D). Die Hinterläufe wurden dann seitlich am Körper vorbeigeführt, was zu einer watschelnden wackligen Fortbewegungsweise führte. Die Vorderläufe waren ebenfalls nicht mehr in der Lage den Körper vom Boden zu heben (Abb. 20C und 20D). Der Bauch hatte während des Gehens und Laufens ständig Bodenkontakt. Bei einigen Tieren wurde zusätzlich noch eine Spastik zur beschriebenen Beeinträchtigung der Beweglichkeit beobachtet. In Abbildung 20B ist ein Tier mit einer solchen Spastik abgebildet. Die Maus war zuvor in Richtung der Bildecke unten links gelaufen, der kraftlose Schwanz zeigt immer noch in die vormalige Bewegungsrichtung. Der rechte Hinterlauf arretierte in der fotografierten ausgestreckten Haltung durch eine Spastik und das Tier lief somit eine Rechtskurve. Eine Spastik entsteht durch eine Übererregbarkeit von  $\alpha$ -Motorneuronen, welche durch die unterbleibende Inhibition durch die Pyramidenbahnen bedingt wird.

Alle Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Tiere zeigten mit einem Alter von 4 Monaten eine unnatürliche Krümmung der Wirbelsäule (Abb. 20D). Im nächsten Abschnitt wurde das Skelett der Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäuse eingehender untersucht, um die Ursache für die auffällige Haltung zu ermitteln. Die Buckelbildung im Sitzen gilt als ein Indiz für eine ausgeprägte Schwäche der Rückenmuskulatur (Abb. 20A). Derartige Auffälligkeiten werden für viele Spezies wie auch für den Menschen beschrieben. Eine krankhafte Krümmung der Wirbelsäule begleitet von einer beeinträchtigten Beweglichkeit resultiert häufig aus muskulärer Insuffizienz der Rückenpartie.



Abb. 20: Der klinische Phänotyp adulter Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Mäuse. A: Kyphose im Sitzen. B: Eine Spastik des rechten Hinterlaufs liess die Maus eine Kurve laufen, der Schwanz zeigt in die ursprüngliche Laufrichtung. C und D: Die Tiere zeigen eine Fehlhaltung der Hinterläufe

und sind nicht in der Lage ihren Bauch vom Boden zu heben. Der dünne, fast immobile Schwanz mit seinen schwachen Knicken ist in allen 4 Bildern gut zu erkennen. Die zuvor beschrieben Myf5-mutanten Mauslinien Myf5<sup>m1</sup> und Myf5<sup>nlacZ</sup> wiesen eine Anomalie des Skeletts auf, dem die distalen Rippen fehlten (Abb. 14C). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen war das Skelett Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> mutanter Mäuse bei der Geburt unauffällig ausgebildet (Abb. 14F). Trotz des anfänglich fehlerfrei ausgebildeten Skeletts war die Körperhaltung adulter Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäuse auffällig (Abb. 20).



**Abb. 21:** Skelettfärbungen von Wildtyp und Myf5<sup> $\Delta lox P/\Delta lox P</sup>$  Mäusen mit Alizarin-Rot und Alcian-Blau. A: Seitenansicht des Skeletts von Wildtyp (A) und Myf5<sup> $\Delta lox P/\Delta lox P</sup>$  (B) Mäusen. C (wt) und D (Myf5<sup> $\Delta lox P/\Delta lox P$ </sup>): Ventrale Sicht auf den Brustkorb und das Sternum. E (wt) und F (Myf5<sup> $\Delta lox P/\Delta lox P$ </sup>): Seitenansicht der Wirbelsäule nach Entfernung der Rippen. G: Normale Lordose beim Wildtyp. H: Fast rechtwinkliger Übergang von der Hals- in die Brustwirbelsäule bei der Myf5<sup> $\Delta lox P/\Delta lox P</sup>$  Maus ermöglicht den Blick auf das ungefärbte zentrale Nervensystem.</sup></sup></sup>

Um die möglichen Ursachen für die Ausbildung der buckeligen Rückenhaltung weiter einzugrenzen wurden Skelettanfärbungen von Wildtyp und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen mit Alizarin-Rot und Alcian-Blau durchgeführt. Die ventrale Sicht auf den Brustkorb weist nur geringe Unterschiede zwischen Mutanten und Wildtyp innerhalb der physiologischen Bandbreite auf (Abb. 21C und 21D). Das freistehende Ende des Sternums ist bei der Mutante etwas dünner angelegt. Die Seitenansicht des Skeletts von Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen zeigte eine Verkrümmung der Wirbelsäule (Abb. 21B). Nach Entfernung der Rippen wurde der Blick auf den Verlauf der Wirbelsäule frei (Abb. 21E bis 21J). Eine fließende Lordose beim Übergang der Hals- in die Brustwirbelsäule konnte in der Wildtypsituation beobachtet werden (Abb. 21G). Der Processus spinosus der Maus ist im Gegensatz zum Menschen am Wirbel CVIII (Vertebra prominens) stärker ausgeprägt.

Mit dem Ziel die Ursache der auffälligen Körperhaltung Myf5-defizienter Mäuse weiter einzugrenzen wurden die Extremitätenknochen auf Fehlbildungen untersucht. Die Knorpelbildung und der Grad der Verknöcherung der Skelette von Wildtyp- und Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Mäusen waren miteinander vergleichbar, eine milde Vakuolenbildung in den Knochen der Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Mäuse wurde detektiert (Ergebnis nicht gezeigt). Betroffen waren Scapula, Humerus, Ulna, Radius und ein Großteil der Mittelhandknochen in der Vorderextremität, sowie Fußknochen und Schwanzwirbel. Die beobachteten Abweichungen vom Wildtypskelett reichen nicht aus, um die Haltungsdefizite von Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Mäusen zu verursachen.</sup></sup></sup>

# 6.1.5.3 Der Schwanz von Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen

Der Schwanz von Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen ist in Abbildung 20 auf allen 4 Bildern dünn und spannungslos, weist milde Knicke sowie Unregelmäßigkeiten im Durchmesser auf. Ab der dritten Lebenswoche wird ein geringes Dickenwachstum beobachtet, wohingegen das Längenwachstum normal erfolgt. Bei heterozygoten Tieren und Wildtypmäusen nimmt der Schwanz während der Juvenilphase konstant an Länge und Dicke zu.

Der dünne Schwanz Myf5-mutanter Mäuse kann nicht wie bei Wildtypen zum Gewichtsausgleich beim Klettern oder zum Stehen auf den Hinterläufen genutzt werden. Die Immobilität und der unterdurchschnittliche Durchmesser des Schwanzes legten die Vermutung nahe, dass die Skelettmuskulatur in den Mutanten insuffizient ausgebildet war. Die Skelettmuskulatur ist in Wildtyp und Mutante in einem vergleichbaren Maß ausgebildet (Abb. 22), jedoch fehlen die stützenden knorpeligen Elemente im Schwanz der Mutante fast vollständig. Analog dem nicht induzierten Rippenblastem der Myf5<sup>m1/m1</sup>Mutanten wird in den Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen ein Knorpeldefekt im Schwanz beobachtet.



Abb. 22: Mit dem Kryomikrotom erstellte Schwanzquerschnitte 0,5 cm (A und B) und 1,5 cm (C und D) distal von der Schwanzwurzel. In A und С sind die Schnitte der  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ Mutante und in B und D die der Wildtypmaus dargestellt. In der Mitte der Querschnitte ist die lockere Struktur der Bandgraue scheiben zu sehen, die in konzentrischen Kreisen vom

Knochen umgeben sind. Die Muskulatur in den Mutanten ist normal ausgeprägt (Pfeilspitzen), jedoch fehlen fast sämtliche knorpeligen Stützelemente (Pfeile). Trichrome-Färbung.

# 6.1.6 Die Muskulatur adulter Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäuse

Der Transkriptionsfaktor Myf5 hat eine Schlüsselfunktion in der Determinierung sowie der weiteren Entwicklung von Skelettmuskulatur. Der für Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Mäuse beobachtete schwere klinische Phänotyp wurde wahrscheinlich durch eine Fehlentwicklung der Skelettmuskulatur hervorgerufen. Eine eingehende histologische Untersuchung der Skelettmuskulatur von Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Mäusen wurde am Beispiel von Arm, Bein und Rücken durchgeführt.</sup></sup>

Die histologische Untersuchung zeigte keinen Einfluß der Myf5-Defizienz auf Struktur, Größe und Verteilung der Skelettmuskulatur. Querschnitte durch die Rückenmuskulatur von Wildtyp und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mutanten wiesen keine Abweichungen von einander auf (Ergebnis nicht gezeigt). Untersucht wurden Rückenquerschnitte von 2 und 6 Monate alten Männchen. Auffällig war die im Längs- wie im Querschnitt beobachtete erhöhte Anzahl zentralständiger Myotubenkerne in homozygoten Myf5-Mutanten (Abb. 23A und 23B).



**Abb. 23:** Skelettmuskulatur aus Oberschenkel (A) und Triceps brachii (B) einer  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ Maus. Die Muskulatur ist bis auf eine geringfügig erhöhte Anzahl zentralständiger Kerne unauffällig ausgebildet (Vergrößerung in B). Trichrome- (A) und Van Gieson-Färbung (B) auf Parafinschnitten.

## 6.1.7 Die Anzahl von Satellitenzellen in adulten Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen

Skelettmuskulatur ist ein postmitotisches Gewebe, welches einen Vorrat regenerierender Satellitenzellen direkt unter der Basalmembran der Myotuben aufweist. Diese ruhenden Zellen werden im Falle von Übung oder Verletzung mitotisch aktiv, um eine für die Regeneration ausreichende Anzahl von myogenen Zellen zur Verfügung zu stellen. Die Skelettmuskulatur von Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen weist eine erhöhte Anzahl von zentralständigen Kernen in den Myotuben auf. Ein Regenerationsdefekt oder eine verstärkte Regeneration der Skelettmusklatur können die Ursache sein.

Die Anzahl regenerierender Satellitenzellen in Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen wurde untersucht, da der Transkriptionsfaktor Myf5 in die Satellitenzelldeterminierung involviert ist (Beauchamp *et al.* 2000). Drei unterschiedliche Muskelgruppen aus Rücken, Oberschenkel und Kaumuskulatur von Wildtypen und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen wurden elektronenmikroskopisch untersucht und die Anzahl der Satellitenzellen bestimmt. Die stoffwechselinaktiven Satellitenzellen sind myotubenassoziiert und direkt zwischen Basallamina und Sarkolemma lokalisiert. Satellitenzellkerne sind von einem nur dünnen cytoplasmatischen Saum umgeben und ihr Chromatin ist stark kondensiert und erscheint elektronendicht (Abb. 24, Pfeilspitzen). Myotubenkerne sind Bestandteile der Myotuben, da letztere aus der Fusion von Myoblasten hervorgehen.



**Abb. 24:** Charakterisierung und Diskriminierung von Satellitenzellen und Myotubenkernen unter dem Elektronenmikroskop. In A und B sind je eine Satellitenzelle und ein Myotubenkern in direkter Nachbarschaft von Sarkomeren zu sehen. Satellitenzellen weisen einen dünnen Cytoplasmasaum sowie kondensiertes und elektronendichtes Chromatin auf (Pfeilspitzen). Die stoffwechselaktiven Myotubenkerne (Pfeile) haben aufgelockertes Chromatin. Mittig in Bild A ist die Basallamina gut als hellgraue fibrillär amorphe Substanz zu erkennen.

In Abbildung 24B kann man den Nukleolus, den Ort der Ribosomensynthese gut als mittelgraue kreisförmige Struktur erkennen, das Chromatin von Myotubenkernen ist größtenteils nicht kondensiert. Ein sichtbarer Nukleolus ist ein Zeichen für eine starke biosynthetische Aktivität, wie sie für Skelettmuskulatur charakteristisch ist. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen Myotuben- und Satellitenkernen sind die drei zwischen Sarkomeren und Kernchromatin lokalisierten Membranen im Falle von Satellitenzellen: Kerndoppelmembran, Sarkolemma und Myotubenmembran. Myotubenkerne sind nur durch die Kernhülle von den Sarkomeren getrennt. Die Lokalisation der Satellitenzellen zwischen Plasmalemma der Myotuben und Basallamina bei gleichzeitig intensiver Chromatinkondensation wurden als hinreichende Kriterien für ihre Identität angesehen. Die Anzahl der Satellitenzellen war in allen 3 untersuchten Muskeltypen geringer als im Wildtyp (Tab. 9). Im Rücken war der Anteil der Satellitenzellen von 3,45% auf 2,47% um 28% und im Oberschenkel um 30% gesunken (Abb. 24B). Im Kaumuskel wurde für den Wildtyp ein Satellitenzellanteil von 5,12% ermittelt. In der Mutante betrug ihr Anteil an der Gesamtkernzahl mit 2,53% nur die Hälfte.

	Satelliten-	Myotuben-	total	Anteil Satelliten-
	zellen	kerne		zellen in %
Mutante	13	520	533	2,44 %
Quadriceps				
Wildtyp	14	388	402	3,48 %
Quadriceps				
Mutante	9	347	356	2,53 %
Maseter				
Wildtyp	23	426	449	5,12 %
Maseter				
Mutante	11	434	445	2,47%
Latissimus				
Wildtyp	17	475	492	3,45%
Latissimus				

Tab. 9: Satellitenzellanzahl in  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ Wildtyp und  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ Mutante. Die Mutante weist in Oberschenkel-, Kauund Rückenmuskulatur eine verringerte Anzahl von regenerierenden Satellitenzellen auf. Die Gesamtanzahl der

untersuchten Zellen beträgt N = 2686. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. G. Hause).



Abb. 25: Prozentualer Anteil der Satellitenzellkerne von allen Nuklei der Myotuben. Das linke Säulenpaar bezieht sich auf den hinteren Oberschenkelmuskel, das mittlere auf die Rückenmuskulatur und das rechte auf die Kaumuskulatur. (Werte: Tab. 9).

### 6.1.8 Einfluß verschiedener Myf5 Genotypen auf die Muskelgeneration

Satellitenzellen sind in regenerierende Prozesse involviert (Seite 24 pp unter 4.6). Der Einfluß der erniedrigten Satellitenzellanzahl in Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mutanten auf die Regeneration sollte untersucht werden. Das möglicherweise vom Wildtyp abweichende Regenerationsverhalten von MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mutanten sollte hier im Anschluß an eine induzierte Verletzung untersucht werden. Die Ergebnisse der MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse waren von besonderem Interesse, da in ihnen zuvor eine geringe Rekombinationsrate des gefloxten Myf5<sup>loxP</sup>Allels beobachtet wurde. Der MCK-Promotor wird erst in Myotuben aktiv. Satellitenzellen werden embryonal als Myf5-positive Zellen angelegt, die dann in einer Regenerationssituation um den Zeitpunkt der Myotubenfusion Myf5negativ würden. Der Organismus von MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäusen hätte im Vorfeld der Regenerationssituation nicht die Gelegenheit gehabt, sich während der Entwicklung an die Abwesenheit des Myf5-Gens zu adaptieren. Eine mögliche Adaptation an die Abwesenheit des Myf5-Proteins könnte in Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mutanten mit Anbeginn der Myogenese erfolgen. Als Kontrolle wurden Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse verwendet, die bis auf die beiden inserierten loxP-Erkennungssequenzen und eine zusätzliche BamHI-Restriktionsschnittstelle keine weiteren genetischen Abweichungen von der Wildtypsituation aufweisen.



**Abb. 26:** Regeneration von Wadenmuskulatur 20 Tage nach Verletzung von Tieren der Genotypen Myf5<sup>loxP/loxP</sup> (A, D, G), MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup> (B, E, H) und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> (C, F, I). Die regenerierte Skelettmuskulatur der Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse ist bis auf wenige zentralständige Myotubenkerne und einen etwas verringerten Myotubendurchmesser weitgehend rekonstituiert. Die Muskulatur von MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup> und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen weist eine große Anzahl mononukleärer Zellen in den regenerierenden Bereichen auf. Die Myotuben haben einen merklich geringeren Durchmesser und die vergrößerten Myotubenkerne sind perlschnurartig aufgereiht. In den Bildern E, H und F ist eine fortgeschrittene Zystenbildung erkennbar. Alle Tiere waren 6 Monate alt. Trichrome-Färbung auf Parafinschnitten stellt Skelettmuskulatur kirschrot dar, andere Gewebe sind pink und Fibroblasten blau gefärbt.

20 Tage nach einer induzierten Verletzung durch Vereisung wurde in Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäusen eine von unverletzter Skelettmuskulatur geringfügig abweichende Morphologie beobachtet. Die Anwesenheit zentralständiger Kerne in den Myotuben deutete auf die vormalig stattgefundene Fusion aktivierter Satellitenzellen mit der verletzten Muskulatur hin. Der Myotubendurchmesser in den regenerierenden Arealen war leicht verringert. Diese Beobachtungen stimmen mit den beschriebenen Daten für die Regenerationssituation in Wildtypmäusen überein. Der Myotubendurchmesser normalisiert sich im weiteren Verlauf der Regeneration und die Myotubenkerne nehmen eine randständige Position in der Myotube ein.

Die Regeneration in den beiden Myf5-defizienten Mauslinien verlief hingegen scheinbar fehlerhaft. Aufgrund der großen Schwankungsbreite innerhalb des Regenerationsassays sind die nachfolgenden Ergebnisse nicht signifikant! Die von der Wildtypsituation am stärksten abweichenden Proben werden nachfolgend beschrieben. 20 Tage nach der Verletzung waren zahlreiche mononukleäre Zellen im regenerierenden Gewebe sichtbar. Die *de novo* gebildeten Myotuben besaßen zum Teil einen geringeren Durchmesser als Myotuben des Wildtyps. Zysten hatten sich inmitten der Muskulatur gebildet, die nach Trichrome-Anfärbung nicht die für Skelettmuskulatur typische kirschrote Farbe annahmen. Desweiteren wurden blau anfärbende Areale in der Skelettmuskulatur beider Mutanten sichtbar. Fibroblastische Strukturen werden mittels Trichrome-Färbung blau dargestellt, so dass diese auffälligen Bereiche als Orte starker Fibrose eingestuft wurden.

Morphologische Unterschiede konnten in der regenerierenden Skelettmuskulatur von MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>- und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen ausgemacht werden. Die in MCK-Cre<sup>+/-</sup> :Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten gebildeten Myotuben besitzen untereinander einen ähnlichen Durchmesser und perlschnurartig aneinandergereihte Kerne. Dieses gleichförmige Erscheinungsbild konnte in der Skelettmuskulatur von Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen nicht beobachtet werden. Die Anzahl mononukleärer Zellen war in Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen gegenüber MCK-Cre<sup>+/-</sup> :Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten scheinbar erhöht. Eine auffällige Morphologie sich bildender Myotuben und das Auftreten einer Fibrose konnten in einigen Proben beobachtet werden. Die Schwankungsbreite der im Regenerationsassay erzielten Resultate läßt jedoch keine signifikanten Aussagen zu.

### 6.1.9 Die Regeneration in Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:Mdx<sup>-/</sup>°Mäusen

Die Regeneration von vereistem Gewebe führt wie zuvor beschrieben schnell zu drastischen Phänotypen, schwache Regenerationsdefizite können auf diesem Weg ausfindig gemacht werden. Die Einkreuzung einer Punktmutation im X-chromosomal vererbten DystrophinGen in den genetischen Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Hintergrund führte im Falle von Homozygotie bzw. Hemizygotie bei Männchen zu dystrophischen Veränderungen der Skelettmuskulatur (Sicinski *et al.*, 1989; Ahn and Kunkel, 1993). Eine kontinuierliche Regeneration in der Skelettmuskulatur ist die Folge. Es ist nicht bekannt, dass die Satellitenzellen im Rahmen einer Dystrophie in ihrer Funktion beeinträchtigt sind. Die regenerierende Eigenschaft von Satellitenzellen kann vom eingekreuzten Genotyp abhängig untersucht und mit dystrophischer Muskulatur verglichen werden.

### 6.1.9.1 Der Muskeldystrophie-Phänotyp

In Muskeldystrophie-Mäusen ist ab der zweiten Woche nach der Geburt eine starke Nekrose der Muskelfasern zu beobachten, die durch eine hohe Regenerationsfähigkeit die Integrität der Skelettmuskulatur nicht beeinträchtigt (Sicinski *et al.*, 1989; Ahn and Kunkel, 1993). Beim Durchleben dieser Krise werden neue Myotuben angelegt, die durch Hypertrophie und Hyperplasie die in einer 1,7 fachen Muskelmasse im Vergleich mit dem Wildtyp resultiert. Die Anzahl der Myotuben ist gegenüber dem Wildtyp um 25% erhöht, der Myotuben-durchmesser beträgt durchschnittlich das 4-fache. Aufgrund des ständigen Regenerationsgeschehens in der Skelettmuskulatur weisen 70 bis 80% der Myotuben zentralständige Kerne auf (Anderson *et al.;* 1987). Homozygote Mdx-Mäuse sind fertil und weisen eine normale Lebenserwartung auf.

# 6.1.9.2 Der Mdx Phänotyp in Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:Mdx<sup>-/</sup>°Mäusen

Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Männchen wurden mit homozygoten Mdx<sup>-/-</sup>Weibchen verpaart, die resultierende F1-Generation war doppeltheterozygot für die beiden beobachteten Gene (Tab. 10A). Die Weibchen der F1-Generation (Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:Mdx<sup>-/wt</sup>) wurden mit homozygoten Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>-Männchen gekreuzt. 50% der F2-Männchen waren hemizygote Mdx-Träger, die Hälfte von ihnen war zusätzlich homozygot für das Myf5<sup>ΔloxP</sup>Allel und konnte einfach durch den dünnen Knickschwanz erkannt werden (Tab. 10A und 10B). Die Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>: Mdx<sup>-/o</sup>Tiere sind lebensfähig und fertil. Sie sind bis auf den für Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Tiere beschriebenen klinischen Phänotyp unauffällig. Weder der Gang noch die Kyphose verschlechterten sich. Parafinschnitte durch Oberschenkel, Oberarm und Kaumuskulatur zeigten dagegen ein anderes als das für Mdx-Mäuse bekannte Bild. Die Nekrose von Myotuben und die Heterogenität der Myotubendurchmesser (Abb. 27) nahmen zu. Die bei Mdx-Tieren vordergründige Hyperplasie wich in den Doppelmutanten einem erhöhten Grad an Hypertrophie. Die Anzahl zentralständiger Kerne und der Grad der Fibrose war deutlich erhöht im Vergleich mit Mdx-Tieren.

Α		
$Myf5^{\Delta loxP/wt}:Mdx^{+/o} x$ $Myf5^{\Delta loxP/wt}:Mdx^{+/-}$	Männchen	Weibchen
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP:Mdx<sup>+/-</sup></sup>	11 (6,25)	7 (6,25)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP:Mdx<sup>+/+</sup></sup>	7 (6,25)	3 (6,25)
$Myf5^{\Delta loxP/wt}$ : $Mdx^{+/-}$	19 (12,5)	11 (12,5)
$Myf5^{\Delta loxP/wt}$ : $Mdx^{+/+}$	11 (12,5)	15 (12,5)
Myf5 <sup>wt/wt</sup> :Mdx <sup>+/-</sup>	3 (6,25)	3 (6,25)
Myf5 <sup>wt/wt</sup> :Mdx <sup>+/+</sup>	7 (6,25)	3 (6,25)
		N = 11 Tiere

В		
$Myf5^{\Delta lox P/\Delta lox P} x$	Männchen	Weibchen
$Myf5^{\Delta loxP/wt}:Mdx^{+/\circ}$		
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP:Mdx<sup>+/-</sup></sup>	5 (12,5)	0 (12,5)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/<math>\Delta</math>loxP</sup> :Mdx <sup>+/+</sup>	22 (12,5)	9 (12,5)
$Myf5^{\Delta loxP/wt}$ : $Mdx^{+/-}$	17 (12,5)	0 (12,5)
Myf5 <sup><math>\Delta</math>loxP/wt</sup> :Mdx <sup>+/+</sup>	17 (12,5)	30 (12,5)
	]	N = 23 Tiere

**Tab. 10:** Prozentuale Verteilung der erhaltenen Genotypen aus den Verpaarungen A:  $Myf5^{\Delta loxP/wt}:Mdx^{+/\circ} x Myf5^{\Delta loxP/wt}:Mdx^{+/-}; B: Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP} x Myf5^{\Delta loxP/wt}:Mdx^{+/\circ}.$  Die erwartete statistische Wahrscheinlichkeit ist in Klammern angegeben (N = Anzahl der Tiere).



Abb. 27: Oberschenkelmuskulatur  $Mdx^{-/\circ}:Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ von und Mdx<sup>-/o</sup>Mäusen. In der Muskulatur der Doppelmutanten ist der Myotubendurchmesser variabler und die Fibrose fortgeschrittener als in reinen Mdx Tieren. In Mdx<sup>-/o</sup>:  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$  Doppelmutanten wirken die Kerne aufgebläht und zentralständige Kerne sind in einer höheren Dichte in den Myotuben vorhanden. Nekrotische Myotuben sind schwarzbraun angefärbt,

fibrotische Bereiche sind pinkfarben. Färbung nach VanGieson.

Die Diaphragmendicke wird als Parameter für die Gesamtmasse der in einer Maus vorhandenen Skelettmuskulatur angesehen (Stedman *et al.*, 1991) und die 1,7-fache Muskelmasse von Mdx-Tieren, spiegelt sich im 1,7-fach dicker ausgebildeten Diaphragma wieder. Die Diaphragmen von Tieren des Genotyps Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:Mdx<sup>-/o</sup> weisen keine histologischen Unterschiede zu ausschließlich an Mdx erkrankten Tieren auf (Abb. 28). Die Grade von Nekrose, Fibrose, Hypertrophie und Hyperplasie, sowie die Anzahl zentralständiger Kerne sind bei beiden mutanten Mauslinien im gleichen Maße ausgeprägt.



**Abb. 28:** Die Diaphragmendicke bei Mdx-Tieren. Gezeigt sind Diaphragmen von Wildtypen (A, D) sowie von Tieren mit den Genotypen Mdx-/° (B, E) und Mdx<sup>-/°</sup>:Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> (C, F). Die Pfeilspitzen zeigen auf nekrotische Myotuben, die Pfeile weisen auf Orte mit erhöhter Fibrose hin. Alle Tiere waren männlich und 6 Monate alt. Färbung nach VanGieson.

## 6.1.10 Die Elektrophysiologie von Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen

Bei einer Ableitung von spontanen neuronal verursachten Aktionspotentialen der Skelettmuskulatur kann die Aktivität einer Vielzahl Motorischer Einheiten gleichzeitig aufgenommen werden. Die Potentiale können dann durch einen Algorythmus unterschiedlichen Motorischen Einheiten zugeordnet werden. Wesentliche Parameter sind Dauer, Höhe und Verlauf eines Potentials. Alle 3 Messgrößen werden zur Identifikation und Zuordnung einer Aufzeichnung zu einer bestimmten Einheit genutzt. Amplitude und Potentialdauer sind die aussagekräftigsten Parameter, um sie mit Aufzeichnungen auffälliger Skelettmuskulatur zu vergleichen. 0-Durchgänge hingegen sind methodisch bedingt sehr artefaktanfällig und wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Um eindeutig zu interpretierende Daten durch die Messungen zu erhalten, wurden männliche 13 Monate alte Tiere eines Wurfes mit gemischtem Mausstammhintergrund untersucht. Die Tiere waren bei der Datenerhebung anfänglich sehr aufgeregt, da die Erdung mit einer für Untersuchungen am Menschen geeigneten Manschette sich als problematisch darstellte. Da Mäuse sind mit einem dichten Fell bewachsen sind wurde die Erdung erschwert. Anstatt die Tiere großflächig zu rasieren, wurden die Erdungsmanschette und das Fell der Tiere angefeuchtet, um die Leitfähigkeit zu erhöhen.



Abb. 29: Graphen von elektrophysiologischen Ableitungen spontaner Muskelaktionspotentiale im Oberschenkel der Maus. 1/1 bis 1/4 sind im Wildtyp detektiert worden. 1/5 bis 1/8 sind Gra- $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ phen von mutanten Mäusen. Die Potentialdauer und die Amplitu-



**Abb. 30:** Messung spontaner Aktionspotentiale im Oberschenkel lebender Mäuse. Die beobachteten Parameter Amplitude [mV], Dauer [ms], Frequenz [Hz] und Anzahl der Phasen [n] der Aktionspotentiale sind zwischen Wildtyp in der oberen Reihe und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mutante in der unteren Reihe unterschiedlich aber bei der Probenanzahl nicht signifikant. Die untersuchten Tiere waren männlich und 13 Monate alt. Erstellt und ausgewertet mit Toennies Multiliner<sup>®</sup>Evolution 1.70c.

de sind jeweils unter dem Graph angeführt.

Die wt Maus wies bei ersten Ableitungen spontaner Aktionspotentiale anfänglich eine höhere Amplitude der Potentiale als die Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Mutante auf - wahrscheinlich auch eine höhere Potentialdichte pro Zeit (Daten nicht gezeigt). Die Erhebung weiterer Datenreihen führte dann zu Unterschieden zwischen den Aufzeichnungen von Wildtyp und Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Mutante (Abb. 29). Die Aufzeichnungen weisen eine vergleichbare Potentialdauer auf, die Amplituden und Frequenzen weichen voneinander ab. Die Anzahl der Phasen ist in der Mutante erhöht. Die Ableitungen der spontanen Potentiale wiesen eine Vielzahl von gleichzeitig detektierten Aktionspotentialen auf, so dass eine sehr stringente Zuordnung der Potentiale zu den verschiedenen motorischen Einheiten erforderlich wurde. In Abb. 30 sind die Meßergebnisse graphisch zusammengefaßt. Unterschiede in den Aufzeichnungen (Abb. 30) von Mutante und wt entstehen durch die größere Quantität von Messungen an der Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sup>Mutante. Die durchschnittlich gemessen Frequenzen der Aktionspotentiale von Wildtyp (28,5 Hz) und Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Mutante (15,2 Hz) weichen deutlich von einander ab (Abb. 30).</sup></sup></sup>

# 6.2 Der Einfluß verschiedener MRF-Genotypen auf die Skelettmuskulatur

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neben den Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mutanten weitere lebensfähige MRF-defiziente Mauslinien erstellt. Über die Dicke der Diaphragmen sollte der Einfluß des jeweiligen Genotyps auf die Skelettmuskelmenge untersucht werden. Für die notwendigen Verpaarungen zur Generierung der Genotypen Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:Myf6<sup>m1/wt</sup>, Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>, Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>, Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:MyoD<sup>-/-</sup> wird auf entsprechende Stellen in dieser Arbeit verwiesen.

- Das Diaphragma von Myf5<sup>∆loxP/wt</sup>:Myf6<sup>m1/wt</sup>Doppelmutanten (siehe auch 6.1.3.1) war stärker ausgebildet (Abb. 31B), als jenes des Wildtyps (Abb. 31A). Es lag eine leichte Hyperplasie vor. Die Anzahl von myotubenassoziierten Kernen war sichtbar erhöht.
- Das Diaphragma von Tieren des Genotyps MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup> (siehe auch 6.1.2.6) war aufgrund einer leichten Hypoplasie nur geringfügig dünner als das der Wildtypmaus (Abb. 31C).

- Das Diaphragma von Myf5<sup>△loxP/△loxP</sup>Tieren war unauffällig in Dicke und Myotubenmorphologie (Daten nicht gezeigt).
- Myf5<sup>m1/wt</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Mäuse sind laut Rudnicki *et al.* nicht lebensfähig, da ihre Muskelmasse nur 50% der im Wildtyp vorhandenen Menge entspricht (Rudnicki *et al.,* 1993). Diese Muskelmengenabnahme wurde auch in Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Mäusen (siehe auch 6.1.4) beobachtet, sie sind jedoch lebensfähig und fruchtbar (Abb. 31D und 31E). Die beobachtete Muskelmassenabnahme um 50% wird durch eine Muskelhypoplasie hervorgerufen.
- Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Mäuse (siehe auch 6.1.4) sind lebensfähig und fertil. Die Tiere entwickeln eine unauffällige Skelettmuskulatur (Daten nicht gezeigt).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 4 lebensfähige Mauslinien etabliert, die zuvor mit analogen Allelen als perinatal letal beschrieben wurden:  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ ,  $Myf5^{\Delta loxP/wt}$ : $Myf6^{m1/wt}$ ,  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ : $MyoD^{+/-}$ ,  $Myf5^{\Delta loxP/wt}$ : $MyoD^{-/-}$ . Die Anzahl der Myotuben im Diaphragmenquerschnitt blieb unabhängig vom untersuchten Genotyp mit einer durchschnittlichen Anzahl von n=8 konstant.



**Abb. 31:** Diaphragmendicke in Abhängigkeit von Nullallelen myogener Transkriptionsfaktoren. Die Myotubenanzahl über den Diaphragmenquerschnitt ist unabhängig von den jeweiligen Genotypen mit n=8 konstant. A: Wildtyp. B: MCK-Cre: Myf5<sup>loxP/loxP</sup>, C: Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:Myf6<sup>m1/wt</sup>, D: Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>. Alle Tiere waren 1 Jahr alt.

# 6.3 Kein Rippenphänotyp bei Myf5<sup>-/-</sup>Mäusen durch frühe somitomale FGF6-Expression

Der erste im frühen Myotom detektierbare Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF6 wird von Myf5-exprimierenden Zellen sezerniert. Die FGF6-Expression setzt ca. 0,5 Tage nach dem Beginn der Myf5-Expression ein (Marics *et al.*, 1989; DeLapeyrière *et al.*, 1990; 1993). Das in Myf5<sup>m1/m1</sup>Embryonen mit 2-tägiger Verspätung exprimierte FGF6-Protein kann *in vitro* die Osteogenese stimulieren (Grass *et al.*, 1996). Die Abwesenheit von FGF6-Protein in Myf5<sup>m1/m1</sup>Embryonen zu einem Zeitpunkt der angenommenen Rippenblasteminduktion wurde als Ursache des Rippenphänotyps vermutet. Durch die vom Myf5-Promotor vermittelte Expression der FGF6-cDNS sollte der Rippenphänotyp in Myf5-defizienten Mäusen umgangen werden.

## 6.3.1 Die Generierung und Etablierung der Myf5<sup>FGF6ki</sup>Mauslinie

Zunächst wurde ein Zielvektor erstellt, mit dem die FGF6cDNS unter Kontrolle des endogenen Myf5-Promotors gebracht werden sollte (freundliche Gabe von Markus Köster; Klonierung siehe 5.2.5). Die Generierung des Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allels wurde mittels Southerblotanalyse von genomischer DNS detektiert (Abb. 32E). 2 unterschiedliche genomische Fragmente des Myf5-Lokus wurden zur Identifizierung der Myf5<sup>FGF6ki</sup>Mutation verwendet. Probe 1 diente als exogene Probe, deren komplementäre Sequenz dem mutagenisierten Myf5-Lokus benachbart ist, jedoch außerhalb des Zielvektors liegt. Mit Probe 1 konnte die korrekte homologe Integration des Zielvektors in den endogenen Myf5-Lokus aufgezeigt werden. Mit der endogegenen Probe 2 wurde die Anwesenheit der mit dem Zielkonstrukt eingeführten zusätzlichen BamHI-Schnittstelle des Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allels detektiert. Hierdurch konnte aufgezeigt werden, ob das Crossover bei der homologen Rekombination stromaufwärts von der loxP-Sequenz im 5'-Bereich des Myf5-Gens stattfand, und somit das vollständige Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allel des Zielvektors in den endogenen Myf5-Lokus inseriert wurde.

In Bahn 1-3 wurde die durch die Probe 1 detektierte *in vitro* Mutagenese des endogenen Myf5-Lokus zum Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allel dargestellt. In Bahn 1 ist die 15 kb große Bande des Myf5<sup>wt</sup>Allels zu sehen. Bahn 3 (Abb. 32C) zeigt das in den endogenen Myf5-Lokus inserierte Myf5<sup>FGF6ki</sup>Zielkonstrukt, welches noch eine PGK-Neo/HSV-tk-Kassette trägt (McBurney *et al.*, 1991; Thomas und Carpecchi, 1987). Das Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allel wird nach Exzision der Doppelselektionskassette durch eine 11 kb-Bande detektiert (Abb. 32D Bahn 94

der Doppelselektionskassette durch eine 11 kb-Bande detektiert (Abb. 32D Bahn 2). Die Entfernung der Doppelselektionskassette wurde *in vitro* durch transiente Transfektion mit dem Cre-Rekombinaseexpressionsplasmid pMC-Cre erreicht. Von 81 analysierten ES-Zellklonen wiesen 41 (51 %) die ausschließliche Exzision der Doppelselektionskassette auf. Bei 28 (35 %) Klonen kam es zu einer Exzision zwischen den beiden äußeren loxP-Sequenzen, die FGF6-cDNS und 2 kb stromaufwärts gelegene Sequenzen wurden deletiert.



Abb. 32: Mutagenese des Myf5-Lokus mit dem Ziel die FGF6-cDNS durch den endogenen Myf5 Promotor zu exprimieren. A: Zielvektor B: Genomischer MRF4/Myf5 Gencluster. C: Vom Zielvektor getroffenes Myf5-Allel. D: Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allel nach Entfernung der Doppelselektions-kassette E: Southernblotanalyse genomischer BamHI-gespaltener DNS zwecks Detektion der sukzessiven Mutagenese des Myf5-Lokus: (Bahn 1 bis 3) in vitro bzw. in juvenilen Mäusen (Bahn 4 bis 6). Die verwendeten Proben 1 und 2 sowie die damit detektierten

DNS-Restriktionsfragmente sind in B bis D (in rot) angegeben. Bahn 1 bis 3 sind mit Sonde 1 hybridisiert worden, Bahn 4 bis 6 hingegen mit Sonde 2. Restriktionsschnittstellen: A, AfIII; B, BamHI; E, EcoRI; L, BgIII; S, ScaI.

ES-Zellen mit diesem Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allel wurden in 3,5 tägige Blastocysten injiziert und nach Blastocystentransfer in scheinschwangere F1-Fostermütter chimäre Mäuse erzeugt. Ein weibliches und zwei männliche Tiere wurden geboren. Das niederchimäre Männchen verstarb vor dem Erreichen der Geschlechtsreife, das hochchimäre Weibchen war infertil. Das hochchimäre Männchen wurde mit mehreren C57bl/6 Weibchen verpaart, und alle Nachkommen wiesen ein agoutifarbenes Fell und ein Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allel auf. Die Keimbahntransmission des chimären Myf5<sup>FGF6ki/wt</sup>-Männchens war erfolgreich (Tab. 11A). Die so erhaltenen lebensfähigen heterozygoten Myf5<sup>FGF6ki/wt</sup>Mäuse waren phänotypisch unauffällig und fruchtbar. Um für das FGF6-*Knock-in*-Allel homozygote Tiere zu generieren wurden hete-

rozygote Myf5<sup>FGF6ki/wt</sup>Mäuse untereinander verpaart (Tab. 11B). Die Nachkommen dieser Verpaarung wurden ab einem Alter von 3 Wochen genotypisiert. Es wurden keine lebenden homozygoten Myf5<sup>FGF6ki/FGFki</sup>Mäuse beobachtet, die homozygote *Knock-in*-Mutation im Myf5-Lokus resultiert in pränataler oder früher postnataler Letalität.

Α				
Myf5 <sup>FGF6ki</sup> Chimäre x	Männchen	Weibchen		
C57bl/6				
Myf5 <sup>FGF6ki/wt</sup>	34 (25)	38 (25)		
Myf5 <sup>FGF6wt/wt</sup>	14 (25)	14 (25)		
	1	N= 107 Tiere		
B				

5			
Myf5 <sup>FGF6ki/wt</sup> x	Myf5 <sup>FGF6ki/FGF6ki</sup>	Myf5 <sup>FGF6ki/wt</sup>	Myf5 <sup>wt/wt</sup>
Myf5 <sup>FGF6ki/wt</sup>	in %	in %	in %
E 18,5	19,5 (25)	61 (50)	19,5 (25)
1 Monat alt	0 (25)	60 (50)	40 (25)
			N= 70 Tiere

**Tab. 11:** A: Prozentuale Verteilung der aus der Verpaarung der männlichen Myf5<sup>FGF6ki</sup>Chimäre mit mehreren C57bl/6 Weibchen hervorgegangenen Genotypen. B: Prozentuale Verteilung der Genotypen von Nachkommen der Verpaarung Myf5<sup>FGF6ki/wt</sup> x Myf5<sup>FGF6ki/wt</sup> zum Embryonalstadium E 18,5 *p.c.* und einen Monat nach der Geburt. Die erwartete statistische Wahrscheinlichkeit ist in Klammern angegeben (N = Anzahl der Tiere).

## 6.3.2 Die Myf5<sup>FGFki/FGF6ki</sup>Maus weist einen normalen Brustkorb auf

Durch Verpaarung von zwei heterozygoten Myf5<sup>FGF6ki/wt</sup>Mäusen und Entnahme der Embryonen am Tag E 18,5 *p.c.* sollte untersucht werden, ob homozygote Myf5<sup>FGF6ki/FGF6ki</sup>Embryonen dieses Entwicklungsstadium erreichen, oder das neu generierte Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allel einen frühen negativen Einfluß auf die Embryogenese hat (Tab. 11B). Die erhaltenen Embryonen wurden dem Protokoll für die Anfärbung von Knorpelsubstanzen (5.1.12.5) folgend behandelt, um den Einfluß des Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allels auf die Rippenbildung sichtbar zu machen. Aus der präparierten Haut wurde DNS gewonnen und zur Genotypisierung der Embryonen verwendet. Das Ergebnis der Southernblotanalyse mit der exogenen Probe 2 ist in Bahn 4 bis 6 zu sehen (Abb. 32E). Die 3 aus der Verpaarung Myf5<sup>FGF6ki/wt</sup> heterozygoter Tiere zu erwartenden Genotypen (Myf5<sup>wt/wt</sup>, Myf5<sup>FGF6ki/wt</sup>, Myf5<sup>FGF6ki/FGF6ki</sup>) wurden beobachtet. In Bahn 4 ist die 15 kb-Bande eines Wildtypembryos zu sehen. Bahn 5 zeigt die 3 kb Bande einer homozygoten Myf5<sup>FGF6ki/FGF6ki</sup>Maus. Bahn 6 weist jeweils eine 3 kb und eine 15 kb wt Bande auf, da es sich hier um die DNS eines heterozygoten Myf5<sup>FGF6ki/wt</sup> Embryos handelt. Nach Anfärbung von Knochen und Knorpel wiesen alle Tiere eines Wurfs einen unauffällig ausgebildeten Brustkorb auf. Die normal ausgebildeten Skelette eines homozygoten Myf5<sup>FGF6ki/FGF6ki</sup>Embryos (Abb. 14C) sowie eines Wildtypembryos (Abb. 14A) sind unter 6.1.3.1 zu sehen. Zum Vergleich ist das Skelett eines homozygoten Myf5<sup>m1/m1</sup>Embryos ohne distale Rippen zu sehen (Abb. 14B). Die Abwesenheit des Myf5-Proteins in den Myf5<sup>FGF6ki/FGF6ki</sup>Embryonen ist wie bei Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Embryonen (Abb. 14F) hat keinen negativen Einfluß auf das Auswachsen distaler Rippen. Die Myf5<sup>FGF6ki/FGF6ki</sup>Embryonen sind trotz des voll ausgebildeten Brustkorbs nicht lebensfähig.

## 7 Diskussion

## 7.1 Überblick

Für die beiden Myf5-*Knock-out*-Mauslinien Myf5<sup>m1</sup> und Myf5<sup>nlacZ</sup> wurde bisher angenommen, dass die um 1,75 Tage verspätete Myotomdeterminierung zum Wegfall eines vom Myotom sezernierten Faktors führt. Das Fehlen dieses Signals sollte ursächlich für den beobachteten letalen Rippenphänotyp sein (Braun *et al.*, 1992; Tajbakhsh and Buckingham, 1994). Angenommen wurde die Existenz eines nicht näher bekannten diffusiblen Faktors, der im Wildtyp vom frühen Myotom in das benachbarte Sklerotom sezerniert wird und dort das Rippenblastem induziert. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in der lebensfähige und fruchtbare Myf5-defiziente Mäuse (Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>) analysiert wurden, konnte diese Annahme verworfen werden. Durch die Datenlage läßt sich ein prinzipieller Einfluß der frühen Myogenese auf die Rippenformation ausschließen. Myf5-Defizienz führt in adulten Mäusen zu einem klinischen Phänotyp und Auffälligkeiten in der Skelettmuskulatur.

# 7.2 Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus

# 7.2.1 Ursachen für die uneffiziente Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus

Die erfolgreiche durch Cre-Rekombinase vermittelte Exzision gefloxter DNS-Abschnitte ist vielerorts beschrieben worden (Lobe et al., 1999; Nagy A., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch mitunter eine sehr uneffiziente Rekombination des Myf5<sup>loxP</sup>Lokus beobachtet. Der Myf5<sup>loxP</sup>Lokus ist als durch Cre-Rekombinase inaktivierbares Allel mechanistisch voll funktionsfähig. Die frühe vom Cre-Deleter-Allel ausgehende Cre-Rekombinaseexpression ist ausreichend, um eine vollständige Exzision des gefloxten DNS zu vermitteln (Abb. 15C). immer wieder unvollständig rekombinierte Cre-Deleter<sup>+/-</sup> Es sind aber auch :Myf5<sup>(\Delta)loxP/(\Delta)loxP</sup>Mäuse beobachtet worden. Die Rekombination störende Einflüße können die Unerrreichbarkeit des gefloxten Lokus durch Kondensation und andere Mechanismen der Chromatininaktivierung sowie ungenügende Cre-Rekombinaseexpression sein (Fiering et al., 1995; Gerber et al., 1997). Cre-Rekombinase vermittelte Rekombinationsereignisse finden nur in Zellen statt, die mindestens noch einen Zellzyklus im Cre-Rekombinasepositiven Zustand durchlaufen (Beauchamps et al., 2001; Loonstra et al., 2001). Diese Beobachtung erklärt die ungenügende Rekombination kondensierter DNS, wie sie in mitotisch inaktiven Zellen beobachtet werden kann. Die Deletion des gefloxten Myf5-Lokus in postmitotischen Myotuben muß uneffizient ausfallen, wenn der beobachtete Mechanismus zutrifft. Dieser Erklärungsansatz trifft für alle hier diskutierten Rekombinationsversuche zu und greift unabhängig von der möglicherweise nicht ausreichenden Cre-Rekombinaseexpression durch die Cre-Deleter-, MCK-Cre- und Mx-Cre-Allele oder Adv5-Cre.

### 7.2.1.1 Negative Einflüsse auf die Aktivität des Cre-Deleter-Allels

Die frühzeitige partielle Inaktivierung eines X-Chromosoms in weiblichen Embryonen führt möglicherweise zu einer mosaikhaften Cre-Rekombinaseexpression, da das Cre-Deleter-Allel bei der verwendeten Mauslinie X-chromosomal vererbt wird. Die Rekombination des gefloxten Myf5-Allels ist somit in all den Zellen unzureichend, in denen das die Cre-Deleter-Kassette tragende X-Chromosomen als Barr-Körperchen vorliegt. Weibliche Embryonen zeigen in einem solchen Fall eine chimäre Myf5-Expression, die in einer heterogen ausgebildeten Skelettmuskulatur resultiert. Eine derartige Situation könnte auch der unvollständigen Rekombination des Embryos in Abbildung 15C zugrunde liegen.

## 7.2.1.2 Die Exzision des Myf5<sup>loxP</sup>Allels in der Mx-Cre-Mauslinie

Der endogene Mx-Promotor wird im Wildtyp durch die Interferone IFN $\alpha$  oder IFN $\beta$  aktiviert. Diese für die experimentelle Applikation sehr teuren Induktoren können den Mx-Promotor möglicherweise stärker aktivieren, als das in dieser Arbeit verwendete pIpC. Die doppelsträngige RNS pIpC simuliert eine Virusinfektion in der Maus, die dann im Rahmen von Abwehrmaßnahmen den Mx-Promotor stimuliert. Möglicherweise wird auf diesem indirekten Weg der Mx-Promotor nicht optimal angesprochen. Die Verwendung von IFN $\alpha$  oder IFN $\beta$  als Induktoren im Experiment könnte in einer gesteigerten Effizienz der Myf5-Exzision resultieren. Die durch den pIpC-induzierten Mx-Promotor vermittelte Cre-Rekombinaseexpression ist nicht ausreichend, um das Myf5<sup>loxP</sup>Allel zu rekombinieren. Die Eignung der Mx-Cre-Maus, gefloxte Allele in reifer Skelettmuskulatur adulter Tiere zu rekombinieren, kann somit aufgrund der Datenlage verneint werden. Die Dosierung des Induktors gestaltet sich zusätzlich schwierig, da optimale Konzentrationen des Induktors zu erhöhter Sterblichkeit der Mäuse während der 8 Tage währenden Versuchsperiode führten.

Suboptimale Dosierungen des Induktors führten hingegen zu einem verringerten Rekombinationsgrad (Daten nicht gezeigt).

## 7.2.1.3 Die MCK-Cre vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Allels

Die vom MCK-Cre-Allel vermittelte Exzision des Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Lokus ist uneffizient. In 9 Monate alten MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäusen wurden abhängig von der Art der Skelettmuskulatur bis zu 30% der gefloxten Myf5-Allele rekombiniert. Dieses unerwartete Resultat wurde mittels Southernblotanalyse für 15 gewebespezifische DNS-Präparationen ermittelt. Der muskelspezifische MCK-Cre-Promotor ist schon vor der Geburt ab dem Stadium E 14,0 p.c. aktiv und vermittelt postnatal lebenslänglich eine starke Expression. Eine effiziente Rekombination des gefloxten Myf5<sup>loxP</sup>Allels war deshalb erwartet worden. Um die Aktivität des MCK-Cre-Transgens aufzuzeigen, wurde ein weiteres gefloxtes Allel (Z/AP) auf dessen Exzisionsverhalten untersucht. Durch die Verpaarung des MCK-Cre-Mausstamms mit der Z/AP-Reporterlinie konnte nachgewiesen werden, dass in der Skelettmuskulatur die Expression des MCK-Cre-Transgens hinreichend ist, um ein gefloxtes Allel zu 100% aus dem Genom zu eliminieren. Eine Erklärung für die unvollständige Exzision des Myf5-Allels wäre eine mögliche Negativselektion von Myf5-negativen Satelliten- oder myogenen Stammzellen. Wenn nicht rekombinierte Muskelvorläuferzellen einen Vorteil in ihrem Teilungs- oder Differenzierungsverhalten aufwiesen, würden sie mit viel höherer Effizienz am Aufbau von Skelettmuskulatur beitragen.

Das Myf5-Gen wird in aktivierten Satellitenzellen exprimiert. Wahrscheinlich wird der Myf5-Lokus in aktivierten Satellitenzellen beim Übergang in die terminale Differenzierung stark kondensiert, bevor der MCK-Promotor in den fusionierten Myotuben aktiv wird. Die Einkreuzung des MyoD<sup>-/-</sup>Hintergrund in die MCK-Cre<sup>+/-</sup>:Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mauslinie sollte in dieser Frage weitere Klarheit schaffen. MyoD als Muskelvorläuferzellen determinierender Faktor steht in MyoD-defizienten Mäusen nicht zur Verfügung. Die Muskelvorläuferzellen werden ausschließlich durch Myf5-Expression determiniert. Im Verlauf der embryonalen Myogenese übernimmt Myf5 zusätzlich die Funktion des MyoD-Gens. Eine etwaige Inaktivierung des Myf5-Lokus in Wildtypen wäre somit in MyoD-defizienten Mäusen nicht mög-MCK-Cre<sup>+/-</sup> Rekombination der gefloxten Myf5-Allele hätte in lich. Die :Myf5<sup>loxP/loxP</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Mäusen viel erfolgreicher verlaufen sollen als in MCK-Cre<sup>+/-</sup> :Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mutanten. Die Rekombinationseffizienz des Myf5<sup>loxP</sup>Allels wird nicht durch

die Abwesenheit des MyoD-Gens beeinflußt. Eine mögliche Kondensation des Myf5-Lokus in der späten Myogenese kann somit nicht nachgewiesen werden.

#### 7.2.1.4 Adenovirus vermittelte Rekombination

Die Vorversuche mit den Adenoviren Adv5-LacZ und Adv5-Cre haben gezeigt, dass die lokale Injektion nur zu schwer reproduzierbaren Resultaten führte. Die Injektion von Adv5-LacZ und Adv5-Cre in Pln13-Mäusen führte bei vergleichbarer *iu* (infective units) zu unterschiedlichen systemischen und lokalen Infektionsherden (Abb. 13C und 13D).

Die Adenovirusvektoren schienen die Basallaminae innerhalb der Skelettmuskulatur nicht überwinden zu können, da die beobachtete Adv5-Infektion räumlich einschränkt war (Abb. 13B). Die effiziente Infektion der Wadenmuskulatur hatte eine starke Immunantwort zur Folge, die in der Lyse des infizierten Gewebes mündete. Die starke Immunantwort könnte auch auf verbleibende Restmengen von CsCl in Viruspräparation beruhen, da die Adenoviren auf einem CsCl-Kissen aufkonzentriert wurden. Die starke Immunantwort und die teilweise systemische Infektion anderer Gewebe führten zu dem Schluß, dass die auf Adenovirusvektoren basierende Cre-Rekombinaseexpression für die Inaktivierung des Myf5-Gens ungeeignet war. Die weitere Anwendung dieses Systems unterblieb, da die möglichen Erfolgsaussichten als gering eingeschätzt wurden.

# 7.3 Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Tiere sind Myf5-*Knock-out*-Mäuse

Durch die Einkreuzung des Cre-Deleter Allels in Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Mäuse wurde eine lebensfähige Myf5-defiziente Mauslinie etabliert. Durch Wholemount-*in-situ*-RNS-Hybridisierung wurde nachgewiesen, dass weder Myf5- noch Myogenin-Expression zum Stadium E 9,5 *p.c.* detektierbar waren. Im frühen Myotom von Wildtypembryonen kann Myogenin-RNS ab E 8,5 *p.c.* nachgewiesen werden. Das in frühen Myotuben vorkommende MHC-Protein konnte in Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sup>Embryonen während des Stadiums E 9,5 *p.c.* immunhistochemisch nur im Herzen und nicht somitomal nachgewiesen werden. Das MHC-Gen liegt in Myotomentwicklung stromabwärts von Myf5. Die frühe durch Myf5-Expression vermittelte Myotombildung unterbleibt in Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Embryonen (Abb. 17B und 17D). Die verwendeten Nachweismethoden waren derart sensitiv, dass eine verbleibende Restaktivität der Myf5-Expression in fast vollständig rekombinierten Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Embryonen detektiert werden konnte (Abb. 15C). Die Abwesenheit jeglicher Skelettmuskulatur in Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>:MyoD<sup>-/-</sup></sup></sup></sup> Embryonen und die daraus resultierende Phänokopie von Myf5<sup>m1/m1</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Embryonen wurde als weiterer Nachweis der Myf5-Defizienz angesehen (Abb. 19).

FGF6 liegt stromabwärts von Myf5 und wird vom Myotom sezerniert. Die unauffällige myotomale FGF6-Expression von Myf5<sup> $\Delta loxP/\Delta loxP</sup>$ Embryonen der Stadien E 10,5 *p.c.* und E 12,5 *p.c.* zeigte, dass MyoD ab E 10,0 *p.c.* die Myotomdeterminierung mit 2-tägiger Verspätung erfolgreich initiert. Die für Myf5<sup> $\Delta loxP/\Delta loxP</sup>$ Embryonen ermittelten Expressionsmuster stimmen mit jenen für den Myf5<sup>m1/m1</sup>*Knock-out* publizierten Daten überein.</sup></sup>

### 7.4 Analyse Myf5 defizienter Mäuse

### 7.4.1 Mögliche Ursachen für Rippenphänotypen in MRF-Mutanten

*Knock-out*-Mäuse für die MRFs Myf5, MRF4 und Myogenin zeigen in variablem Maße Fehlbildungen des Brustkorbs, obwohl keiner dieser Faktoren in Knorpelgeweben oder Knorpelvorläufern exprimiert wird. Den untersuchten Genen wurde zunächst ein direkter Einfluß auf die Rippenbildung zugeschrieben, ein indirekter Einfluß wird mit wachsender Datenlage jedoch für die meisten *Knock-outs* immer wahrscheinlicher. Der beim Myogenin-*Knock-out* beobachtete unvollständig ausgebildete Brustkorb stellt eine Phänokopie des mit dem MRF4/Myf5-Lokus assoziierten Rippenphänotyps dar, da das Myogenin-Gen auf einem anderen Chromosom als der MRF4/Myf5-Kluster liegt (Braun *et al.*, 1992; Hasty *et al.*, 1993; Nabeshima *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1996). Die beobachteten Rippendeformationen setzen sich aus zwei unterschiedlichen Phänotypen zusammen (Vivian *et al.*, 2000): Dem verspäteten Auswachsen der ventralen Rippen (Vivian *et al.*, 2000) und einer vom Wildtyp abweichenden Definition der rostro-caudalen Grenzen der Interkostalmuskulatur, die dann in fusionierten Rippen und/oder Myotuben resultieren (Rawls *et al.*, 1998). Folgende Ursachen für die beobachteten Rippenphänotypen lassen sich aus den Resultaten der verschiedenen MRF-defizienten Mausmutanten ableiten.

- 1. Die in den mutierten MRF-Lokus inserierte PGK-Neo-Selektionskassette übt ihrerseits einen Einfluß auf in die Rippenbildung involvierte Gene in *cis* oder *trans* aus.
- Die bloße Anwesenheit der PGK-Neo-Kassette nimmt Einfluß auf die Chromatinstruktur eines weitere Gene umfassenden DNS-Abschnitts (Fiering *et al.*, 1995; Gerber *et al.*, 1997).

- 4. Die Anwesenheit normal ausgeprägter Interkostalmuskulatur ist eine Voraussetzung für eine räumlich und funktional unauffällige Ausbildung des Brustkorbs.
- Sich nicht gegenseitig ausschlie
  ßende *cis* oder *trans*-Interaktionen von Myf5 und MRF4 beeinflussen die Rippenblasteminduktion.
- Ein vom frühen Myotom sezernierter Faktor, wie z.B. FGF4, FGF6 oder PDGFA beeinflußt die Induktion des Rippenblastems (Grass *et al.*, 1996, Tallquist *et al.*, 2000).

# 7.4.1.1 Der Einfluß der PGK-Neo-Selektionskassette in *cis-* und *trans*

Störungen der Regulation benachbarter oder weit entfernter Gene sind nicht nur im Zusammenhang mit dem MRF4/Myf5-Lokus beschrieben worden. Im Rahmen der Inaktivierung der Fringe-Gene ist die Orientierung der PGK-Neo-Selektionskassette maßgeblich (Moran *et al.*, 1999a; Moran *et al.*, 1999b; Zhang and Gridley 1999). In der gleichen Orientierung der Selektionskassette, wie der des inaktivierten Radical Fringe Gens (Rfng) wird kein (!) Phänotyp durch die Abwesenheit des in der Formation der AER (Apikale Ektodermale Leiste) involvierten Gens verursacht. Im Falle der entgegengesetzten Orientierung kommt es zu verkleinerten Kiefern, einer offenen Kiefergaumenspalte, Exenzephalie und Syn- oder Oligodaktylie. Die beobachteten Defekte sind zum Großteil in Geweben lokalisiert, die nicht der Expressionsdomäne von Rfng entstammen. Moran *et al.* postulieren einen Einfluß der Selektionskassette auf die Regulation eines oder mehrerer benachbarter Gene.

Zhang und Gridley sehen nicht in der Anwesenheit der Kassette an sich das mögliche Regulationsproblem beim Rfng-*Knock-out*, weisen aber auf eine potente Splice-Akzeptor-Sequenz innerhalb der Selektionskassette hin, die in der letalen Orientierung zum Tragen kommt (Fiering *et al.*, 1995; Zhang and Gridley, 1999). Ein kryptisches Spliceprodukt könnte somit in *trans* durch RNS-Interferenz oder ein Fusionsprotein die Expression anderer Gene beeinflussen. Die Auskreuzung auf verschiedene Mausstammhintergünde hatte keinen Einfluß auf den Phänotyp der Rfng-Mutanten. Die Deletion aller Rfng-Exons führt zu keinen Auffälligkeiten in Rfng-defizienten Mäusen, so dass scheinbar die Splice-Akzeptor-Sequenz in der PGK-Neo-Kassette für die gestörte Entwicklung verantwortlich zeichnet.

Scacheri *et al.* beschreiben einen anderen Effekt der PGK-Selektionskassette im Rahmen der Inaktivierung des Men1-Gens (Scacheri *et al.*, 2001). Ein neues zusätzliches Transkript des vermeintlich inaktivierten Gens wird detektiert, dessen Expression im Vergleich mit dem ursprünglichen Men1-Gens um das Vierfache erhöht ist. Ein hieraus resultierendes Protein ist hingegen nicht nachweisbar. Das neue Transkript weist antisense Sequenzen der PGK-Promotorregion und die normal orientierten Basenabfolgen der stromabwärts liegenden Exone 5 bis 10 des Men1-Gens auf. Der PGK-Promotor wirkt in diesem Fall als bidirektionaler Promotor, der die Transkription von einem internen Start-Codon initiert.

Der in den Myf5-defizienten Mauslinien Myf5<sup>m1</sup> und Myf5<sup>nLacZ</sup> beobachtete Rippenphänotyp könnte folglich auf einem neuen Transkript basieren, welches mit anderen mRNS interferiert, oder aber dessen translatiertes Produkt einen negativen Einfluß auf andere in die Rippenentwicklung involvierte Gene hat (Scacheri *et al.*, 2001). Durch die potentielle Splice-Akzeptor-Sequenz im PGK-Promotor besteht die Möglichkeit, ein Fusionsprotein mit einigen funktionalen Domänen des ursprünglichen Myf5-Proteins zu erhalten. Derartige *trans*-Effekte können sich in Zellen wie denen des Sklerotoms, die nicht dem Myotom zuzuordnen sind, manifestieren.

Die Orientierung der in den Myf5-Lokus inserierten PGK-Neo-Kassette kann ebenfalls einen Einfluß auf den Rippenphänotyp haben. Die PGK-Neo-Kassette ist ausschließlich in der lebensfähigen MRF4-Mutante entgegengesetzt der ursprünglichen MRF4/Myf5 Transkriptionsrichtung inseriert und könnte somit zur Viabilität in der homozygoten Situation beitragen (Zhang *et al.*, 1995; Rawls *et al.*, 1998). Es könnte bei Myf5, wie zuvor für das Radicalfringe-Gen (Rfng) beschrieben wurde, in Abhängigkeit von der Orientierung ein Phänotyp in vom Myotom abweichenden Geweben hervorgerufen werden (Moran *et al.*, 1999a; Moran *et al.*, 1999b).

### 7.4.1.2 Der Einfluß PGK-Neo-Kassette auf die Chromatinstruktur

Die Regulation eines in *cis* gelegenen sklerotomal exprimierten GenX könnte durch die Selektionskassette im Myf5<sup>m1</sup>Allel gestört werden. Im Zusammenhang mit Insertionen der PGK-Neo-Kassette in den β-Globinlokus und mehrere Hox-Kluster wurde ein cis-Einfluß auf ein oder mehrere benachbarte Gene beschrieben. Im Falle einer Insertion der PGK-Neo-Selektionskassette in die Lokuskontrollregion des β-Globin-Gens wurde ein starke Beeinträchtigung der β-Globin-Expression und weiterer Gene in einer Entfernung bis zu 100 kb beobachtet (Fiering et al., 1995; Pham et al., 1996). Nach Exzision der PGK-Neo-Kassette aus dem mutierten Lokus war die Expression der beobachteten Gene der im Wildtyp vergleichbar. Für Knock-outs in mehreren Hox-Klustern wurde ebenfalls ein weitläufiger Effekt der PGK-Neo-Kassette auf direkt und mittelbar benachbarte Gene beschrieben. Anstatt des erwarteten Knock-out-Phänotyps der mutierten Gene Hox-a4 und Hox-d10 wurde ein Mißexpressionsphänotyp von benachbarten Genen beobachtet (Hox-a4: Horan et al., 1994; Hox-d10: Rijli et al., 1994). Durch Insertion einer Punktmutation in das Hox-b4-Gen konnte der erwartete Knock-out-Phänotyp analysiert werden, wohingegen die Insertion der PGK-Neo-Kassette zu einer Überlagerung mit anderen Phänotypen führte (Ramires-Solis et al., 1993). Die Insertion einer MC1-Neo-Selektionskassette in den Hox-a4-Lokus resultierte in ausschließlich dem erwarteten Phänotyp von Hox-a4-defizienten Mäusen (Kostic and Carpecci, 1994; Horan et al., 1994).

### 7.4.1.3 Die räumliche Veränderung des MRF4/Myf5-Lokus

Homozygote Myf5<sup>Cre/Cre</sup>Mäuse tragen durch die in den Myf5-Lokus inserierten Cre-Rekombinase-cDNS ein Myf5-Nullallel mit einer Nettoinsertion, die keine PGK-Neo-Kassette beinhaltet. Obwohl die Cre-Rekombinase keinen Einfluß auf die Myogenese hat und die Myotominduktion in Myf5<sup>Cre/Cre</sup>Embryonen mit 1,75-tägiger Verspätung einsetzt, haben Myf5<sup>Cre/Cre</sup>Mäuse einen milderen Rippenphänotyp als Myf5<sup>m1/m1</sup>Mäuse mit ihrer PGK-Neo-Insertion.

Ein instruktives Beispiel für den störenden Einfluß der PGK-Neo-Kassette im Myf5-Lokus wird im Rahmen des PDGFA-*Knock-in* beschrieben (Tallquist *et al.*, 2000). Das die PGK-Neo-Kassette tragende Myf5<sup>PDGFAN</sup>Allel führt zu einem ausgeprägten Rippenphänotyp, obwohl für PDGFA ein die Rippenbildung stimulierender Einfluß angenommen wurde. PDGFA-Expression konnte in homozygoten Myf5<sup>PDGFAN</sup>Embryonen nur an den dermomytomalen Lippen nachgewiesen werden. Das Myf5<sup>PDGFA</sup>Allel ohne Selektionskassette führt hingegen zu einem milderen immer noch letalen Rippenphänotyp, obwohl PDGFA im gesamten Dermomyotom exprimiert wird. Die größere Nettoinsertion im Myf5<sup>PDGFAN</sup>Allel wirkt in *cis* auf die eigene Expression negativ. Möglicherweise ist die Aktivität der PGK-Neo-Kassette in *cis* und in *trans* für die eingeschränkte PDGFA-Expressionsdomäne verantwortlich.

### 7.4.1.4 Der Einfluß von Interkostalmuskulatur auf den Brustkorb

Als instruktives Beispiel soll die Myogenin<sup>-/-</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>:MRF4<sup>-/-</sup>Dreifachmutante dienen (Valdez et al. 2000). Die frühe Myotombildung wird in diesen Mutanten wie im Wildtyp durch Myf5-Expression vermittelt. Da das viable MRF4-Allel aus dem Labor von Olson (Southwestern Medical School at Dallas) verwendet wurde, ist anfänglich eine leichte Attenuation der Myf5-Expression zu detektieren. Der Einfluß auf die Expression des GenX wäre somit marginal oder nicht vorhanden. Die Induktion des Rippenblastems in der Myogenin<sup>-/-</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>:MRF4<sup>-/-</sup>Dreifachmutante verläuft unauffällig, wie für den Wildtyp beschrieben. Die Myf5-Expression in den mutanten Embryonen fällt innerhalb der ersten zwei Tage stark ab. Die Autoren postulieren, dass in frühen Myoblasten die alleinige Anwesenheit des Myf5-Proteins nicht ausreicht, um seine eigene Expression aufrecht zu erhalten. Die Myoblasten dieser Mutante können nicht fusionieren, somit unterbleibt die Anlage primärer interkostaler Muskulatur in direkter Nachbarschaft zu den kondensierenden Rippenvorläuferzellen. Die stark verkürzten und gebogenen Rippen in der Myogenin-/-:MyoD<sup>-/-</sup>:MRF4<sup>-/-</sup> Dreifachmutante inserieren abweichend vom Myf5<sup>m1/m1</sup>Phänotyp am Sternum. Ein in annähernd normaler Größe angelegtes frühes Myotom reicht nicht aus, um im benachbarten Sklerotom die Ausbildung eines funktionalen Brustkorbs zu induzieren. Möglicherweise sind Kontraktionen oder induktive Signale der primären Interkostalmuskulatur für die unauffällige und räumlich korrekte Ausbildung des Brustkorbs erforderlich.

### 7.4.1.5 Interaktionen zwischen Myf5 und MRF4

Interaktionen von MRF4 und Myf5 in *trans* sind möglich, da beide Transkriptionsfaktoren heterodimerisieren müssen, um DNS binden zu können. *In vitro* wurden überkreuz Interaktionen der MRFs untereinander beschrieben (Sorrentino *et al.;* 1990; Crescenzi *et al.;* 1990), wenn auch nicht direkt zwischen MRF4 und Myf5 (Braun *et al.,* 1989a). *Cis*-Interaktionen sind wahrscheinlich, weil die beiden Gene direkt benachbart auf dem Chromosomen 10 der Maus (Chromosomen 12 beim Menschen) liegen und beide Loci Elemente für die Regulati-

on des jeweils anderen Gens aufweisen (Zweigert et al., 1997; Hadchouel et al., 2000; Summerbell et al., 2000; Carvajal et al., 2001).

# 7.4.1.6 Der Einfluß myotomal sezernierter Faktoren auf das Rippenblastem

Ein häufig verfolgter Ansatz den durch Myf5-Abwesenheit verursachten Rippenphänotyp zu unterbinden, ist die Expressionskontrolle eines das Rippenwachstum fördernden Faktors durch den endogenen Myf5-Promotor. In dieser Arbeit wurde die FGF6-cDNS in den Myf5-Lokus der Maus inseriert. Die homozygoten Myf5<sup>FGF6ki/FGF6ki</sup>Mäuse entwickeln einen völlig unauffälligen Brustkorb. Es ist schwer zu beurteilen, welchen Einfluß die zusätzliche FGF6-Expression auf die Rippenbildung nimmt, da die Myf5-defizienten Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäuse e-benfalls keinen Rippenphänotyp aufweisen. Einem sekundären Effekt kann entnommen werden, dass die FGF6-cDNS vom Myf5-Lokus exprimiert wird. Die homozygoten Myf5<sup>FGF6ki/FGF6ki</sup>Mäuse sterben perinatal, obwohl ihr Brustkorb anatomisch unauffällig ausgebildet ist. Die in Phillip Sorianos Labor generierten *Knock-in*-Mauslinien Myf5<sup>PDGFAN</sup>, Myf5<sup>PDGFA</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> sind aufgrund eines unfunktionalen Brustkorbs homozygot letal (Tallquist *et al.*, 2000).

Eine weitere lebensfähige Myf5-*Knock-in*-Mauslinie trägt die Myogenin-cDNS unter Kontrolle des endogenen Myf5-Promotors und weist keine Insertion einer PGK-Neo-Selektionsassette auf (Wang *et al.* 1996b). Myf5<sup>mygki/mygki</sup>Mäuse weisen keine verspätete Myotomformation auf. Das Myogenin-*Knock-in*-Allel kann die Myf5-Funktion übernehmen (Wang *et al.* 1996b). Im frühen Myotom von Wildtypen wird PDGFA (Platelet Derived Growth Factor A) exprimiert, von dem angenommen wird, dass es in die frühe Rippenbildung involviert ist. In Myf5<sup>myg/myg</sup>Mutanten wird eine sehr schwache PDGFA-Expression erst ab E 10,0 *p.c.* detektiert und ist ausschließlich auf den Einflußbereich des ventralen Myotoms begrenzt (Tallquist *et al.*, 2000). Myogenin kann die Rolle von Myf5 im Rahmen der frühen Myotombildung nicht vollständig übernehmen, die PDGFA-Expression in der Myf5<sup>myg/myg</sup>Mutante ist verzögert bzw. stark abgeschwächt. Die verspätete und unvollständige PDGFA-Expression hat keinen kritischen Einfluß auf die Brustkorbformation (Wang *et al.* 1996b; Wang and Jaenisch, 1997). Myf5<sup>myg/myg</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Doppelmutanten weisen einen perinatal letalen Rippen- und Skelettmuskelphänotyp auf. Wenn die vom Myf5-Promotor exprimierte Myogenin-cDNS eine Myf5 ähnliche Aktivität aufweisen würde, hätte die Doppelmutante eine Phänokopie der vitalen MyoD<sup>-/-</sup>Mäuse mit unauffälliger PDGFA-Expression sein sollen. Lebensfähige Myf5-*Knock-in*-Mutanten weisen eine unauffällige (Myf5<sup>MyoD</sup>) oder gestörte (Myf5<sup>myg</sup>) PDGFA-Expression auf, ohne dass ein Einfluß auf die Rippenbildung erkennbar wäre (Tallquist *et al.*, 2000).

Tallquist *et al.* postulieren für die Rippeninduktion in Myf5<sup>myg/myg</sup>Mäusen nicht aber in Myf5<sup>MyoD/MyoD</sup>Tieren einen alternativen von PDGFA unabhängigen Regulationsweg (Tallquist *et al.*, 2000). Die PDGFA-Expression in Myf5<sup>MyoD/MyoD</sup>Mäusen entspricht der im Wildtyp beobachteten Situation. Dies deutet darauf hin, dass die ohne eine PGK-Neo-Kassette in den Myf5-Lokus inserierte MyoD-cDNS keinen negativen Einfluß auf die Regulation benachbarter rippenrelevanter Gene hat. Möglicherweise kann vom Myf5-Promotor ab E 8,0 *p.c.* exprimiertes MyoD, wie für die Myogenese beschrieben, die Funktion von Myf5 auch in der Rippenblasteminduktion übernehmen. Die Möglichkeit, dass die Rippeninduktion und -formation auch im Wildtyp nicht notwendigerweise der PDGFA-Expression bedürfen, wird bei Tallquist *et al.* nicht weiter diskutiert, obwohl der PDGFA-*Knock-out* einen normal ausgeprägten Brustkorb aufweist (Tallquist *et al.*, 2000; Boström *et al.*, 1996).

## 7.4.2 Der Brustkorb von Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen

Die Abwesenheit des Myf5-Proteins in Myf5<sup>ΔloxP</sup>/ΔloxP</sub>Mäusen und die damit einhergehende um 1,75 Tage verspätete Myotominduktion sind nicht hinreichend, um die Rippenbildung zu behindern (Kaul et al., 2000). Die Brustkörbe von Embryonen wie von adulten Myf5-Mutanten und Wildtypmäusen waren vergleichbar ausgebildet (Abb. 21C und 21D). Das Sternum adulter Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Mutanten war geringfügig dünner ausgebildet als jenes von</sup>  $Myf5^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ :  $MyoD^{+/-}$ :  $Mvf5^{\Delta loxP/m1}$ Wildtypen. Die mutanten Mauslinien  $Myf5^{\Delta loxP/+}$ :MRF4<sup>+/m1</sup> weisen ebenfalls unauffällig ausgebildete Brustkörbe auf. Alle vier Linien zeigen, dass die Induktion des Rippenblastems unabhängig von Myf5-Expression ist. Die vormals von Rudnicki *et al.* als letal beschriebene Myf5<sup>m1/m1</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Mutante war nicht lebensfähig, da in ihr das homozygot vorhandene Myf5<sup>m1</sup>Allel einen perinatal letalen Rippenphänotyp zur Folge hat (Rudnicki et al., 1993). Das durch ein einziges MyoD-Allel verspätet induzierte Myotom der Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Mutante ist hinreichend, um alle notwendigen Interaktionen mit dem Sklerotom zu gewährleisten, die schließlich in einer unauffälligen Ausbildung des Brustkorbs resultieren.
Das Ausbleiben eines Rippenphänotyps in Myf5<sup>ΔloxP/m1</sup> und Myf5<sup>ΔloxP/+</sup>:MRF4<sup>+/m1</sup> Mauslinien weist darauf hin, dass der vom MRF4<sup>m1</sup>Allel und dem Myf5<sup>m1</sup>Allel ausgehende störende Einfluß der PGK-Neo-Selektionskassette heterozygot keinen Einfluß auf die Rippenformation hat. Die Abwesenheit von Myf5-Expression und einem funktionalen MRF4-Allel führt ebenfalls zu keinem Rippenphänotyp. Floss *et al.* haben einen letalen Rippenphänotyp bei doppeltheterozygoten Myf5<sup>m1/+</sup>:MRF4<sup>+/m1</sup>Mutanten beobachtet, da in beiden Allelen des MRF4/Myf5-Klusters die PGK-Neo-Insertion die Rippenformation stört (Floss *et al.*, 1996).

Beobachtungen an der Pax3-Mutante Sp2H stützen die Annahme, dass sich Myf5 und PDGFA nicht im gleichen Signaltransduktionsweg befinden (Henderson *et al.*, 1999). Pax3 wird dermomyotomal exprimiert und scheint somit in einem anderen Signaltransduktionsweg als Myf5 zu liegen. In homozygoten Sp2H-Mutanten wächst das ventrale Myotom nicht aus und die Ausbildung von Interkostalmuskulatur und Rippen endet in Verkürzungen und Fusionen beider Gewebe. Die fehlerhafte Determinierung der anterioposterioren und mediolateralen Achsen in den frühen Somiten ist hierfür ursächlich. In diesen Prozeß ist ebenfalls das MRF4-Gen involviert, welches in die Determinierung der rostro-caudalen Achse von Somiten involviert ist (Vivian *et al.*, 2000). In homozygoten Sp2H-Mutanten sind die myotomale PDGFA- sowie die sklerotomale PDGFR $\alpha$ -Expression räumlich gestört, während die Lokalisation des Myf5-Transkripts fehlerfrei verläuft. Dies deutet auf einen von Myf5 unabhängigen Signaltransduktionsweg für PDGFA/PDGFR $\alpha$  hin, da es trotz unbeeinträchtigter Myf5-Expression zu einem Rippenphänotyp kommt.

Die Abhängigkeit eines *Knock-out*-Phänotyps vom genetischen Hintergrund der Mauslinie stellt einen weiteren Erklärungsansatz dar. Vivian *et al.* beschreiben eine Verstärkung des durch das Hypomorph Myogenin<sup>y/y</sup> verursachten Rippenphänotyps, bei einem Wechsel aus einer gemischten 129S7/C57Bl/6 Mauslinie in einen undefinierten gemischten Stammhintergrund (Vivian *et al.*, 2000). Tallquist *et al.* beschreiben für Myf5<sup>m1/m1</sup> und Myf5<sup>Cre/Cre</sup>Mäuse variabel auftretende Fusionen der Hals- und Brustwirbelkörper. Derartige Fusionen wurden 8 Jahre zuvor bei den ersten Untersuchungen der Myf5<sup>m1/m1</sup>Mäuse zu keinem Zeitpunkt festgestellt, alle Wirbel konnten einzelnen präpariert werden und wiesen keine Deformationen auf (Braun *et al.*, 1992; Tallquist *et al.* 2000). Möglicherweise wären einige der als letal beschriebenen MRF-Mutanten lebensfähig, wenn sie auf einen anderen Stammhintergrund ausgekreuzt würden. Die in dieser Arbeit als vital beschriebene

109

Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Maus wurde Jahre zuvor als Myf5<sup>m1/wt</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Mutante als nicht lebensfähig eingestuft, obwohl das gleiche MyoD-Allel zum Einsatz kam (Rudnicki *et al.,* 1992; 1993).

Für MRF4 sind 3 unterschiedliche Nullmutationen beschrieben worden, die alle durch Deletion genomischer MRF4-Sequenzen und Insertion einer PGK-Neo-Selektionskassette generiert wurden. Die im Labor von E. N. Olson erstellte MRF4-Nullmutante ist homozygot lebensfähig (Zhang et al., 1995). Die von Braun et al. und Patapoutian et al. beschriebenen MRF4-Nullmutanten weisen hingegen einen unterschiedlich ausgeprägten Verkürzungsgrad der distalen Rippen auf, welcher zu perinataler Letalität führt (Braun and Arnold, 1995; Patapoutian et al., 1995). In diesen drei MRF4-Mutanten ist eine mit zunehmendem Grad der Rippenverkürzung einhergehende Verringerung der Myf5-Expression beobachtet worden (Yoon et al., 1997). Der Grad der Rippendeformation korreliert mit der Größe des durch Myf5-Expression angelegten frühen Myotoms (Rawls et al., 1998), da die Myotomgröße direkt von der Menge des exprimierten Myf5-Proteins abhängt. In den kodierenden und nichtkodierenden Bereichen des MRF4/Myf5-Lokus befinden sich Elemente, die für die räumliche und zeitliche Expression der beiden Gene unerläßlich sind (Zweigert et al., 1997; Hadchouel et al., 2000; Summerbell et al., 2000; Carvajal et al., 2001). In der homozygot lebensfähigen MRF4-Knock-out-Mauslinie ist die Myf5-Expression initial nur geringfügig abgeschwächt, bricht dann aber fast vollständig zusammen, so dass auch die Myogeninexpression im frühen Myotom kaum detektierbar ist (Vivian et al., 2000). In der mit dem stärksten Rippenphänotyp behafteten Mauslinie von T. Braun (MRF4<sup>m1</sup>) ist keine Myf5-Expression detektierbar (Floss et al., 1996; Yoon et al., 1997).

Die zwei vormals beschriebenen Myf5-Nullmutanten Myf5<sup>m1</sup> und Myf5<sup>nlacZ</sup> weisen ebenfalls nur gering ausgebildete distale Rippen auf (Braun *et al.*, 1992; Tajbakhsh and Buckingham, 1994). Die Abwesenheit von Myf5 und die damit einhergehende Verzögerung der frühen Myotomformation schienen die Ursache für die beobachteten Rippenphänotypen zu sein. Diese Hypothese wird jedoch durch die Generierung der vitalen Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mauslinie widerlegt, die einen unauffälligen Brustkorb trotz der verspäteten Myotombildung aufweist. Bei der in MRF4-mutanten Mäusen beobachteten Korrelation von Rippenauswuchs und Myf5-Expression handelt es sich somit um einen sekundären Effekt.

### 7.4.3 Ursachen für den vormals beobachteten Rippenphänotyp Myf5defizienter Mäuse

In den zwei letalen Myf5-Nullmutanten Myf5<sup>m1</sup> und Myf5<sup>nlacZ</sup> wurden nur die proximalen Rippen angelegt, der distale Anteil der Rippen war völlig abwesend. Deutet man die von Tallquist *et al.* beschriebenen nicht lebensfähigen *Knock-in*-Mutanten (Myf5<sup>PDGFA</sup>, Myf5<sup>PDGFA</sup> und Myf5<sup>Cre</sup>) vereinfachend als weitere Myf5-Nullmutanten, so erhält man analog der MRF4/Myf6-Nullallele eine Reihe von unterschiedlich ausgeprägten Rippenphänotypen (Tallquist *et al.*, 2000). Letztere reichen von fehlenden distalen Rippen (Myf5<sup>m1</sup> und Myf5<sup>nlacZ</sup>) über gebogene, fusionierte und gegabelte distalen Rippen bei Myf5<sup>PDGFA</sup>, Myf5<sup>PDGFA</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> bis zu völlig unaufälliger Ausbildung eines funktionalen Brustkorbs im Falle der Myf5<sup>myg</sup>, Myf5<sup>MyoD</sup>, Myf5<sup>FGF6ki</sup>- und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mutanten (Kaul *et al.*, 2000).

Aus den vorgenannten Betrachtungen kann folgender Mechanismus für eine fehlerfreie Rippenbildung abgeleitet werden: Ein in mittelbarer Nachbarschaft zum MRF4/Myf5-Lokus liegendes GenX ist in die Bildung des Rippenblastems involviert. Durch Insertion bzw. Deletion genomischer Sequenzen bei der Konstruktion von MRF4/Myf5 Null- oder *Knock-in*-Mutationen wird die Regulation von GenX in unterschiedlichem Maße in *cis* beeinflußt. Ein instruktives Beispiel stellt die Reihe der MRF4-Mutationen dar. Hier wird in Abhängigkeit von der Konstruktion des *Knock-out*-Allels ein variabler Rippenphänotyp beobachtet. Die Mutation mit der größten Deletion im MRF4-Lokus hat nur einen geringen Einfluß auf die Ausbildung eines funktionalen Brustkorbs, die Mauslinie ist lebensfähig (Zhang *et al.,* 1995). Die im viablen Allel durchgeführte großzügige Deletion der MRF4-Sequenzen wird durch die Insertion der PGK-Neo-Selektionskassette annähernd kompensiert. Das MRF4-Allel (Myf6<sup>m1</sup>; Braun *et al.,* 1994) mit dem am stärksten ausgeprägten Rippenphänotyp, weist auch die größte Nettoinsertion im MRF4-Lokus auf (Braun *et al.* 1995; Yoon *et al.,* 1997).

Die notwendige Interaktion von stromauf- und stromabwärts vom MRF4-Gen gelegenen regulativen Sequenzen für das GenX könnte durch die ausgedehnte Lokalisation gestört sein. Das fehlexprimierte GenX zeichnet möglicherweise nicht alleinig für die verschiedenen heterogenen Rippenphänotypen verantwortlich. Viele Daten lassen neben dem Einfluß von GenX auch noch die Determinierung somitomaler Achsen, die frühe Myotombildung und die Anlage primärer interkostaler Muskulatur als notwendige Regulatoren einer fehlerfreien Rippenbildung erscheinen (Yoon *et al.*, 1997, Zhang *et al.*, 1995; Wang and Jaenisch, 1997; Rawls *et al.*, 1998; Tallquist *et al.*, 2000). Fehlt die Anwesenheit von Muskulatur zwischen den sich bildenden Rippen, so kommt es zu Fehlstellungen und der Ausbildung überzähliger Rippen, die dann häufig noch in sich gegabelt sind oder mit einander fusionieren. Kurze Rippen, die nicht das Sternum erreichen, führen zu Fehlbildungen im Sternum, wie dem Verlust von intersternebralem Knorpel (Rawls *et al.*, 1998). Letzterer entsteht durch Interaktion von Rippenknorpel, welcher im direkten Kontakt mit dem sich entwickelnden Sternum an deren Berührungspunkten die Ossifikation unterbindet (Chen, 1952; 1953).

### 7.4.4 Auffälligkeiten im Skelett von adulten Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen

Das Skelett von Wildtyp und Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mutante war zum Zeitpunkt der Geburt vergleichbar ausgebildet. Die beobachtete starke Kyphose im Thorakalbereich adulter Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Tiere beruht wahrscheinlich auf einem sekundären Effekt. Die mutanten Embryonen haben zum Stadium E 18,5 p.c. eine unauffällig ausgebildete Wirbelsäule (Abb. 14E). Die buckelige Körperhaltung wird erst ab einem Alter von 4 Monaten beobachtet. Deshalb wird angenommen, dass es sich bei den leichten Veränderungen an den Wirbelfortsätzen um Abnutzungserscheinungen handelt (Abb. 21H), die aus der mangelnden Unterstützung der Wirbelkörper durch die Skelettmuskulatur herrühren. Der möglicherweise spontan in Folge von Muskelinsuffzienz auftretende starke Knick beim Übergang von der Hals- in die Brustwirbelsäule scheint die Ursache für weitere Abnutzungserscheinungen zu sein. Durch die extreme Lordose im Cervikalbereich wird der Verlauf der gesamten Wirbelsäule aus dem Gleichgewicht gebracht. Die Wirbelkörper im Lumbarbereich sitzen durch die starke Kyphose nicht mehr in ihren Gelenkpfannen und werden in Folge einer zunehmenden Muskelinsuffizienz nicht gestützt oder in ihrer ursprünglichen Position gehalten. Ein temporäres Einklemmen der austretenden Leiterbahnen könnte für die scheinbare Spastik der Hinterläufe verantwortlich sein. Die in den Extremitäten- und Schwanzwirbelknochen adulter Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Tiere beobachtete Vakuolenbildung beruht auf dem verbleibenden Einfluss des Myf5<sup> $\Delta$ loxP</sup>Allels auf die Expression eines Knorpelgens X. Die Knochen von Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Tieren sind möglicherweise stärker anfällig für Reibung und die resultierende Degradation.

### 7.4.4.1 Ursachen für den Schwanzphänotyp in Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen

In heranwachsenden Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub>Mäusen wurde ein Schwanzphänotyp beobachtet. Eine fehlerhafte Signaltransduktion im Schwanzmyotom Myf5-defizienter Embryonen führt möglicherweise zur fehlerhaften Ausbildung des Schwanzknorpels, der nur rudimentär angelegt wird. Die Schwanzmuskulatur von heranwachsenden Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sup>Mäusen ist hingegen unauffällig angelegt. Auch in den lebensfähigen MRF4-Mutanten wird neben einem generellen Defekt in der Determinierung des gesamten frühen Myotoms eine etwas veränderte Entwicklung in den Somiten der Schwanzregion beobachtet (Vivian *et al.*, 2000). Möglicherweise enthält der im Myf5<sup> $\Delta$ loxP</sup>Allel deletierte DNS-Abschnitt regulatorische Bereiche des KnorpelgensX, welches die Ursache für den vormals beobachteten Rippenphänotyp ist (Zweigert *et al.*, 1997; Hadchouel *et al.*, 2000; Summerbell *et al.*, 2000; Carvajal *et al.*, 2001). Die MRF4-Expression könnte ebenfalls durch die Deletion regulatorischer Sequenzen beeinträchtigt sein. Durch Punktmutation verursachte Nullallele für MRF4 und Myf5 würden in eindeutigen *Knock-out*-Phänotypen resultieren, die ausschließlich auf der Abwesenheit des untersuchten Genprodukts basieren.</sup>

### 7.5 Die Skelettmuskulatur adulter Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäuse

Die Skelettmuskulatur von adulten Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen war makroskopisch unauffällig ausgebildet. Die krankhafte Krümmung der Wirbelsäule wurde zunächst auf eine muskuläre Insuffizienz zurückgeführt, da Myf5 im Wildtyp die tiefe autochtone Rückenmuskulatur determiniert. Bei 2 und 6 Monate alten Tieren konnten keine Auffälligkeiten im Muskelquerschnitt der Extremitäten, des Diaphragmas oder des Rückens ermittelt werden. Die einzige Abweichung von der Wildtypsituation bestand in dem Vorhandensein zentralständiger Kerne in den Myotuben von Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen.

Myotubenkerne sind normalerweise am Rand der Myotuben in direkter Nachbarschaft zur Membran des Synzytiums lokalisiert. Zentralständige Kerne sind indikativ für regenerierende Skelettmuskulatur und werden erst im Laufe der Zeit in die für Myotubenkerne typische randständige Position gebracht. Die Kerne entstammen vormals aktivierten Satellitenzellen, die im Rahmen der Regeneration mit defekten Myotuben fusionierten. Der beobachtete wackelige Gang und die seltener auftretenden Spastiken der Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäuse sind nicht durch histologische Auffälligkeiten der Skelettmuskulatur zu erklären. Es bleibt auch unklar, warum weibliche Tiere den klinischen Phänotyp früher entwickeln. Männliche Mäuse weisen eine im allgenmeinen stärker ausgebildete Skelettmuskulatur auf, und könnten somit zunächst eine einsetzende Beeinträchtigung der Beweglichkeit länger kompensieren.

### 7.5.1 Myotubenentwicklung in Abhängigkeit verschiedener MRFs

Die Annahme, dass neben den spezifischen Eigenschaften der MRF-Familienmitglieder eine Mindesthöhe an MRF-Expression notwendig und hinreichend ist, um eine normale Myogenese zu ermöglichen, wird durch zahlreiche Beobachtungen gestützt. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Überexpression eines MRF-Transkriptionsfaktors in mvogenen Zellinien wie auch in Fibroblasten weitere MRFs hochreguliert werden und deren konzertierte Expression in der Myogenese endet. MRF-Mutanten, die mit einer unauffällig ausgebildeten Skelettmuskulatur geboren werden, sind unter anderem Tiere mit den Genotypen MyoD<sup>-/-</sup>, MRF4<sup>-/-</sup>, Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> und Myf5<sup>ΔloxP/m1</sup> (Rudnicki *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1995; Kaul et al., 2000). Neben den einzigartigen Funktionen der MRF-Trankriptionsfaktoren sind bis auf Myogenin die MRF-Familienmitglieder ersetzbar ist. In MRF-Knock-out-Mäusen werden die verbleibenden MRF-Gene in vielen Fällen kompensatorisch stärker als im Wildtyp exprimiert, so dass die MRF-Gesamtkonzentration für eine unauffällige Myogenese ausreicht. Einige MRF-Doppel- und Trippelmutanten weisen trotz der stark eingeschränkten Ausstattung mit myogenen Faktoren bei der Geburt eine unauffällige Skelettmuskulatur auf. Die Mutanten können in zwei Gruppen eingeteilt werden, (1) Mäuse die lebensfähig und fertil sind und (2) Mäuse die kurz nach der Geburt aus anderen Gründen als aufgrund der muskulären Ausstattung sterben.

- Mäuse mit den folgenden Genotypen sind lebensfähig: Myogenin<sup>+/-</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>: MRF4<sup>-/-</sup>; (Rawls *et al.*, 1998), Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:MRF4<sup>m1/wt</sup>, Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>; mit Einschränkung auch Myf5<sup>ΔloxP/+</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>.
- (2) Durch Mißbildungen des Brustkorbs nicht lebensfähig sind die Mauslinien Myf5<sup>m1/m1</sup>, Myf5<sup>m1/m1</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>, Myf5<sup>nlacZ/nLacZ</sup> und Myf5<sup>m1/+</sup>:MRF4<sup>m1/+</sup>. In den Myf5<sup>m1/+</sup>:MRF4<sup>m1/+</sup> Doppelmutanten ist es das MRF4<sup>m1</sup>Allel, welches die Expression des Myf5<sup>wt</sup>Allels in *cis* unterdrückt (Floss *et al.*, 1996).

Die von Rudnicki *et al.* beschriebene Myf5<sup>m1/m1</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Mutante ist nicht lebensfähig, da in ihr das homozygot vorhandene Myf5<sup>m1</sup>Allel einen perinatal letalen Rippenphänotyp zur Folge hat (Rudnicki *et al.*, 1993). Die Skelettmuskelmasse in Myf5<sup>m1/m1</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Mutanten ist vergleichbar der von Wildtypen, obwohl nur ein MyoD-Allel vorhanden ist. Die myogene Eigenschaft eines MyoD-Allels reicht aus, um die Gesamtheit der im Embryo nötigen Muskelvorläuferzellen zu determinieren. Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Mutanten sind lebensfähig, da sie einen normal ausgebildeten Brustkorb aufweisen. Die Abwesenheit von Myf5 hat auch in dieser genetischen Konstellation keinen Einfluß auf die Rippenbildung oder die Menge angelegter Skelettmuskulatur.

Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Mutanten weisen im Diaphragma nur 50% der Skelettmuskelmasse einer Wildtypmaus auf. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit den von Rudnicki *et al.* beschriebenen Myf5<sup>m1/wt</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Mutante bei der eine 35 bis 55%-ige Reduktion der Skelettmuskelmasse beobachtet wurde (Rudnicki *et al.*, 1993). Auch in dieser Mutante ist die Diaphragmenmuskulatur schwächer als im Wildtyp ausgebildet. Die Tatsache, dass Myf5<sup>ΔloxP/wt</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Mäuse lebensfähig sind, aber Myf5<sup>m1/wt</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Mutanten bei der Geburt versterben ist unerwartet, und könnte durch die höhere Viabilität von Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup> Mäusen gegenüber der MyoD<sup>-/-</sup>Mutante bedingt sein. Die Determinierung von Muskelvorläuferzellen durch ein einziges Myf5<sup>wt</sup>Allel ist in Gegenwart des Myf5<sup>ΔloxP</sup>Allels hinreichend, um in einer Skelettmuskulatur zu resultieren, die den Mäusen das Überleben ermöglicht. Die Tiere der Myf5<sup>myg/+</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Linie hätten folglich ebenfalls lebensfähig sein sollen. MyoD hat ein stärkeres myogenes Potential als Myf5, da ein MyoD-Allel ausreicht um in Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>Mutanten die Determinierung einer unverringerten Skelettmuskelmasse zu vermitteln.

Gerber *et al.* konnten zeigen, dass Myogenin nur 10% des Potentials von Myf5 oder MyoD besitzt, die Transkription muskelspezifischer Gene in kondensiertem Chromatin zu aktivieren (Gerber *et al.*, 1997). Dies könnte dazu führen, dass in Myf5<sup>myg/myg</sup>Embryonen nur in begrenztem Umfang die frühe Ausbildung myotomaler Zellen vermittelt wird, da Myogenin nicht das gleiche Potential wie Myf5 hat, um muskelspezifische Gene zu aktivieren. Die Annahme einer annähernden Inaktivität des Myf5<sup>myg</sup>Lokus wird durch weitere Kontrollverpaarungen gestützt. Myf5<sup>myg/myg</sup>:Myogenin<sup>-/-</sup> doppelmutante Mäuse weisen den gleichen Phänotyp wie ausschließlich Myogenin-defiziente Mäuse auf (Wang and Jaenisch, 1997).

Die Autoren weisen auf die frühe Abschaltung des Myf5-Promotors um Tag E 12,0 *p.c.* hin, die dann den komplementierenden Effekt der Myogeninexpression vom Myf5-Promotor verhindert. Tatsächlich wird die Myf5-Expression ab diesem Stadium schwächer, sie ist aber noch zum Zeitpunkt der Geburt nachweisbar (Rawls *et al.*, 1998). Eine weitere Beobachtung zeigt sehr deutlich, wie mangelhaft das Myf5<sup>myg</sup>Allel die myogene Aktivitätvon Myf5 vermitteln kann. Myf5<sup>myg/myg</sup>:MyoD<sup>-/-</sup> und Myf5<sup>myg/+</sup>:MyoD<sup>-/-</sup> mutante Mäuse sterben direkt nach der Geburt aufgrund ihrer reduzierten Skelettmuskelbildung (Wang and Jaenisch, 1997). Es wurde postuliert, dass die Gesamtdosis an exprimierten MRF-Proteinen für den Eintritt in die Muskeldifferenzierung kritischer ist, als die Spezifität einzelner MRF-Familienmitglieder.

Myogenin<sup>+/-</sup>:MyoD<sup>+/-</sup>:MRF4<sup>-/-</sup> Dreifachmutanten weisen embryonal eine normale Anzahl von Muskelvorläuferzellen auf, die *in vivo* einen partiellen Block innerhalb der Myogenese zeigen. Sie weisen *in vitro* aber die Fähigkeit auf mit einer dem Wildtyp entsprechenden Aktivität zu Myotuben zu fusionieren (Rawls *et al.*, 1998; Valdez *et al.*, 2000). Diese Beobachtung widerspricht der von Wang and Jaenisch aufgestellten Hyopthese, die MRF-Dosis innerhalb einer Zelle müsse nur einen kritischen Schwellenwert überschreiten. Erst Zellen aus dem Myogenin<sup>-/-</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>:MRF4<sup>-/-</sup> Dreifach-*Knock-out* sind *in vitro* nicht mehr in der Lage terminal zu reifen Myotuben zu differenzieren (Valdez *et al.*, 2000). Die Ursache dafür könnte das dem Myf5-Transkriptionsfaktor nicht immanente Potential sein, die Expression von muskelspezifischen Faktoren wie MCK,  $\alpha$ -skeletal Aktin, embryonalem MHC, Desmin und Acetycholin-Rezeptor- $\delta$ -Untereinheit zu aktivieren. Myf5-Expression ist in diesen Dreifachmutanten zum Zeitpunkt der Geburt nicht detektierbar. Es kann geschlossen werden, dass Myf5 allein nicht in der Lage ist, eine effiziente Autoregulation der eigenen Expression aufrecht zu erhalten.

Die Mitglieder der MRF-Familie haben unabhängig von ihren spezifischen Expressionsmustern einzigartige Eigenschaften und weisen unterschiedliche myogene Potentiale auf. Das Postulat, dass vielmehr die exprimierte MRF-Gesamtmenge als die individuellen Qualitäten der Transkriptionsfaktoren ausschlaggebend für eine unauffällige Myogenese seien, kann somit nicht gehalten werden.

#### 7.5.2 Der Einfluß der Myf5-Expression auf die Myotubenreparatur

Myf5 wird in aktivierten Satellitenzellen exprimiert. Eine hohe Myf5-Expression aktivierter Satellitenzellen ist notwendig, um die Differenzierung vorzubereiten. Sobald die Myf5-Expression schwächer wird, endet die Proliferation und die in der Fusion resultierende terminale Myogenese beginnt. Das Absinken oder die Abwesenheit des Transkriptionsfaktors Myf5 in aktivierten myogenen Zellen scheint im Wildtyp eine Voraussetzung für die Myogenin-Expression und anschließende Differenzierung zu sein (Hasty *et al.*, 1993; Nabeshima *et al.*, 1993; Venuti *et al.*, 1995; Carlson B.M., 2001). Die Abwesenheit von Myf5 in aktivierten Satellitenzellen der Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub> Tiere beeinflußt möglicherweise die Myogenin-Expression, da die von Myf5 stromabwärts gelegenen Gene verspätet oder überhaupt nicht aktiviert werden. Eine schwache oder ausbleibende Myogenin-Expression könnte im Myf5-*Knock-out* der uneffizienten Myotubenreparatur zugrunde liegen, da die Fusion zu neuen Myotuben nicht wie im Wildtyp erfolgt. Die Myogenin-Expression ist in Satellitenzellen möglicherweise direkt vom Transkriptionsfaktor Myf5 abhängig.</sup>

Unter der modellhaften Prämisse, dass Myf5 die Proliferation steuert, wäre die in Myf5-*Knock-out*-Mäusen kompensatorisch erhöhte MyoD-Expression eine mögliche Ursache für die beobachtete verringerte Satellitenzellanzahl. Aktivierte Satellitenzellen müssen den Satellitenzellpool wieder aufstocken, nachdem sie durch Teilung eine ausreichende Anzahl von Myoblasten hervorgebracht haben. Die aktivierten MyoD-positiven und Myf5negativen Satellitenzellen münden schneller als im Wildtyp in die Fusion ein, ohne zuvor durch mitotische Aktivität eine ausreichende Anzahl von regenerierenden Zellen zur Verfügung gestellt zu haben. Der Satellitenstammzellpool wird in Folge einer Reparatursituation nicht mehr erneuert. Diese Hypothese wird gestützt durch Beobachtungen an MyoD<sup>-/-</sup> Mäusen. In einer Regenerationssituation differenzieren bei ihnen nur 10% der aktivierten Satellitenzellen, da die Abwesenheit von MyoD einen negativen Einfluß auf die Differenzierung hat (Cornelison *et al.*, 2000). Die möglicherweise kompensatorisch erhöhte Myf5-Expression in aktivierten MyoD-defizienten Satellitenzellen würde die terminale Differenzierung behindern.

Die eingesetzte Methode die Regeneration zu induzieren birgt einige mögliche Fehlerquellen. Die Zerstörung von Muskelgewebe durch die in flüssigem Stickstoff gekühlte Pinzette kann zur Inaktivierung von Satellitenzellen in benachbarten Myotuben führen. Die Dauer der Vereisung von ca. 2 Sekunden birgt eine mögliche Fehlerquelle, da schon geringe zeitliche Abweichungen einen Einfluß auf die Regenerationsfähigkeit des Gewebes nehmen können. Dies könnte zu Verzerrungen bei der Interpretation der Versuchsergebnisse führen, da nur 3 Wildtyptiere und je 6 Mutanten untersucht wurden. Der Probenumfang ist zu gering um signifikante Abweichungen des Regenerationsverhaltens von der Wildtypsituation zu postulieren. Eine Ausweitung des Regenerationsassays mit der verwendeten und weiteren Methoden, wie der lokalen Vergiftung von Myotuben ist notwendig, um belastungsfähige Aussagen treffen zu können.

Bei der in Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen und Mdx<sup>o/-</sup>:Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>- sowie MCK-Cre<sup>+/-</sup>: Myf5<sup>loxP/loxP</sup>Doppelmutanten beobachteten Fibrose handelt es sich wahrscheinlich um einen sekundären Effekt. Die das verletzte Gewebe invadierenden Zellen sind nicht oder nur bedingt myogen. Es kommt zur beobachteten starken Präsenz mononukleärer Zellen im unvollständig regenerierten Gewebe, da in einer Regenerationssituation weniger neugebildete Myotuben die einwandernden Fibroblasten behindern bzw. verdrängen.

#### 7.5.3 Der Einfluß der Basallamina auf die Muskelregeneration

Für Satellitenzellen und ihre Funktion sind Einflüsse durch die extrazelluläre Matrix unersetzbar, da FGFs (Fibroblastenwachstumsfaktoren) und HGF (Hepatozytenwachstumsfaktor) für die Signaltransduktion ihrer Rezeptoren Heparansulfat-Glukosaminoglykane benötigen (Cornelison et al., 2001). Die zu den Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) zählenden Syndecane-3 und -4 werden in inaktiven Satellitenzellen exprimiert. Syndecane sind in die Signaltransduktion von FGFs involviert. Die Expression der Syndecane 3 und 4 wird im Anschluß an eine Satellitenzellaktivierung 96 Stunden aufrecht erhalten und durch einsetzende Syndecan-1 Expression unterstützt. Eine Behinderung der Sulfatisierung der HSPGs führt zum Erliegen der Regeneration trotz Expression der myogenen Transkriptionsfaktoren MyoD, Myogenin und Myf6, sowie MEF2A (Osses and Brandan; 2002). Ursächlich für das Ausbleiben der Myogenese durch Satellitenzellen ist die Abwesenheit von Creatin-Kinaseund  $\alpha$ -Dystroglycan-Expression. Die Aktivierung von Wnt-induziertem MyoD in somitomalen Muskelvorläuferzellen wird von Sonic hedgehog über QSulf1 Expression hervorgerufen (Dhoot et al., 2001). Das zelloberflächenständige QSulf1 gehört zur stark konservierten Familie der Heparan-spezifischen N-Acetyl Glukosamin-Sulfatasen und reguliert die heparanabhängige Wnt-Signaltransduktion. Die Abhängigkeit der MRF-Expression von der Basallamina wird somit deutlich. Wäre die Basallamina durch Myf5-defiziente Zellen bedingt fehlerhaft angelegt oder ausgebildet, so würden die Satellitenzellen mit einer von der Wildtypsituation abweichenden Signaltransduktion konfrontiert und verhielten sich auffällig. Die bei Myf5-defizienten Mäusen beobachtete Fibrose in einer Regenerationssituation, beruht möglicherweise auf einer gestörten Signaltransduktionskette bei der Basallaminabildung.

## 7.5.4 Mdx<sup>-/</sup>°:Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Maus als Modell menschlicher Krankheiten

Mdx<sup>-/o</sup>Mäuse dienen häufig als Modellsystem für die Muskeldystrophie vom Dychenne Typ beim Menschen (Review: Allamand and Campbell, 2000). Eine Punktmutation im Dystrophingen führt zum Funktionsverlust des gebildeten Proteins und resultiert in einer mit der Zeit fortschreitenden Verschlechterung der Skellettmuskulatur, die in Rollstuhlpflicht und vorzeitigem Tod des Betroffenen endet. Mäuse bauen nach einer anfänglichen Krise kompensatorisch die 1,7-fache Muskelmasse auf. Ab der zweiten Lebenswoche ist eine starke Nekrose der Muskelfasern zu beobachten, die durch eine hohe Kapazität an Regeneration die Integrität der Muskulatur nicht beeinträchtigt. Es werden neue Myotuben angelegt, die in einer Hypertrophie der Skelettmuskulatur münden. Die Anzahl der Myotuben ist um 25% erhöht. Der Myotubendurchmesser von Mdx<sup>-/o</sup>Mäusen beträgt mitunter das 4-fache vom Wildtyp und 70 bis 80% der Myotuben weisen als Anzeichen für Regeneration zentralständige Kerne auf (Anderson *et al.*, 1987).

Anders als beim Menschen weisen die Mäuse mit einer Punktmutation im Dystrophingen keinen sekundären Herzphänotyp auf. Mdx<sup>-/o</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>doppelmutante Mäuse kommen mit dem für sie beschrieben klinischen Phänotyp dem Krankheitsverlauf beim Menschen mit einer Kardiomyopathie sehr nah (Megeney *et al.*, 1997). Nach 3 bis 5 Monaten wird eine verstärkte dorsoventrale Biegung der Wirbelsäule beobachtet, wie sie bei menschlichen Dystrophiepatienten als Lordose und Kyphose beschrieben wird. Diese auffällige Körperhaltung wird zusätzlich von einem wackligen Gang begleitet. Mit der Zeit kommt es zu immer geringerer Aktivität und Gewichtsverlust bis die Tiere einjährig versterben. Die Hypertrophie von Skelettmuskulatur aus Mdx-Mäusen ist in Mdx<sup>-/-</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Tieren auffällig reduziert oder fehlt völlig. Die Skelettmuskulatur weist eine bis zu 52%-ige Reduktion im Vergleich zur Mdx-Maus auf (Megeney *et al.*, 1997). Das Diaphragma ist der einzige Muskel in Mdx-Mäusen, der starke dystrophische Veränderungen durchmacht. In Mdx<sup>-/o</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Mäusen sind diese dystrophischen Veränderungen stärker ausgeprägt und führen zu Muskelmasse-

verlust und einer verringerten Dicke des Diaphragmas. In Mdx<sup>-/o</sup>:FGF6<sup>-/-</sup>Mäusen ist die Anzahl MyoD- und Myogenin-positiver Zellen in der Skelettmuskulatur durch die FGF6-Defizienz erniedrigt (Floss *et al.*, 1997). Dies resultiert in einer schwächer ausgeprägten Hypertrophie im Vergleich mit Mdx<sup>-/o</sup>Mäusen.

Die Dicke des Diaphragmas in Mdx<sup>-/o</sup>:Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Doppelmutanten entspricht der von Mdx<sup>-/o</sup> Mäusen. Eine Verschlechterung der Dystrophie durch die Myf5-Defizienz konnte in diesem Gewebe nicht ausgemacht werden. Die dystrophischen Veränderungen in der restlichen Skelettmuskulatur regenerationsgestörter Mdx<sup>-/o</sup>:Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Doppelmutanten sind stärker ausgeprägt als in Mdx<sup>-/o</sup>Mäusen. Die Heterogenität der Myotubendurchmesser, die Anzahl nekrotischer Myotuben und der Grad der beobachteten Fibrose sind in den Mdx<sup>-/o</sup>:Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Doppelmutanten eindeutig erhöht. Die Fähigkeit zur Regeneration in Mdx<sup>-/o</sup>:Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Doppelmutanten ist ähnlich den Mdx<sup>o/-</sup>:Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Doppelmutanten ist ähnlich den Mdx<sup>o/-</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>Tieren stark eingeschränkt. Zentralständige Kerne, ein Indikator für regeneriendes Muskelgewebe, wurden in ähnlich hoher Zahl wie der Mdx-Muskulatur vorgefunden. In den Mdx<sup>-/o</sup>: Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Doppelmutanten ist die Anzahl zentralständiger Kerne im Vergleich mit Mdx-Mäusen erhöht. Möglicherweise sind die aus aktivierten Satellitenzellen hervorgegangenen Myoblasten nicht in der Lage die terminale Differenzierung fehlerfrei zu durchlaufen.

Im Labor von Thomas Braun (Universität Halle-Wittenberg) wird zur Zeit untersucht, in wieweit die für MyoD<sup>-/-</sup>:Mdx<sup>-/o</sup>Mäuse beschriebene schwere Kardiomyopathie auch in Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>:Mdx<sup>-/o</sup> Mäusen beobachtet werden kann (Megeney *et al.*, 1997). Somit wäre das Fehlen von MyoD- oder Myf5-Expression in Mdx<sup>-/o</sup>Mäusen eine mögliche Annäherung an die Situation im Menschen, für den eine schwere Kardiomyopathie im Falle einer Muskeldystrophie vom Dychenne Typ beschrieben wird. Es können in diesem Zusammenhang weitere Erkenntnisse in der Signaltransduktion gewonnen werden, da Myf5 und MyoD nicht im Herzen exprimiert werden, aber in diesem Gewebe ein Phänotyp beobachtet wird. Induktive Prozesse durch benachbarte Gewebe könnten hier eine wichtige Rolle spielen. Die involvierten Gene und ihre diffusiblen Genprodukte könnten somit identifiziert werden.

### 7.5.5 Weitere mögliche Untersuchungen an Myf5-Nullmutanten

Die bisher durchgeführten Untersuchungen an Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mäusen resultieren in keinem schlüssigen Bild für die Ursachen des schweren klinischen Phänotyps. Mehrere Erklärungsmöglichkeiten werden hier angeführt.

Die Verteilung der Myosin Schwere Kette Isoformen (auch MHC für Myosin Heavy Chain) Typ I, IIa, IId/x und IIb ermöglicht die Bestimmung von Muskelfasertypen. Die Expression von NFATC3 (Transkriptionsfaktor: Nuclear Factor of Activated T cells C3), Calcineurin und Myf5/MyoD hat unterschiedliche Einflüße auf die 3 MHC-Promotoren für adulte schnelle Fasern (IIa, IIb und IId/x), die 90% der Myotuben im Skelettmuskel stellen (Kegley *et al.*, 2001; Allen *et al.*, 2001). MHCIIa enthaltenende Myotuben sind klein, stark oxidativ und etwas langsam, MHCIIb-Expression führt zu den größten, schnellsten und am stärksten glykolytischen Myotuben im Organismus. Die MHCIId/x exprimierenden Myotuben weisen intermediäre Eigenschaften dieser Extreme auf. Ein Einfluß der Myf5<sup>AloxP/AloxP</sup>Mutation auf die Zusammensetzung der Fasertypen erscheint möglich. So führt MyoD- oder Myf5-Überexpression zur bevorzugten Aktivierung des MHCIIb-Promotors, der in Myf5-Abwesenheit möglicherweise weniger effizient stimuliert wird. Die Folge wäre eine Verschiebung des Muskelfaserspektrums von MHCIIb zu den anderen adulten MHC-Formen. In Folge von Myf5-Defizienz würden die größten und schnellsten Myotuben innerhalb des Muskelquerschnitts weniger werden.

Der Einfluß fehlender Myf5-Expression könnte mit der frühen Innervation der Myotuben erklärt werden. Direkt nach der Geburt werden alle Muskelfasern einzeln innerviert (Wigston and Sanes, 1982; Rafuse *et al.*, 1996; Zhang and McLennan, 1998). Alle primären Myotuben sind zu diesem Zeitpunkt positiv für MyHC1 (Myosin Schwere Kette 1). Im adulten Muskel findet man keine langsamen Fasern um den den Knochen konzentriert und in unmittelbarer Nähe der Basallamina. Eine Modellvorstellung geht davon aus, dass die innervierenden Nerven zu diesem Zeitpunkt determiniert sind langsame bzw. schnelle Fasern zu kontaktieren. Trifft ein für die Innervation schneller Myotuben determinierter Nerv einhergehend mit der entsprechenden Positionsinformation im Muskel auf eine langsame Faser, so wird sie zu einem schnellen Fasertyp umprogrammiert. Möglicherweise ist die

Signaltransduktion bzw. Signalinterpretation einiger Myotuben durch die Myf5-Defizienz fehlerhaft.

Die erhobenen elektrophysiologischen Rohdaten weisen Unterschiede zwischen wt und Myf5-Mutante auf. Die aufgezeichneten Messungen konnten nicht uneingeschränkt verwendet werden, da die aufgenommenen Aktionspotentiale völlig regelmäßig auftreten müssen, um belastbare Aussagen treffen zu können. Dies war im Rahmen der Datenerfassung mit der benutzten Elektrode nicht möglich. Die Elektrode wurde für Messungen am Menschen konzipiert und stellte sich als mäßig geeignet für Untersuchungen an der Maus heraus, so dass die Tiere sehr aufgeregt waren. Hier besteht Verbesserungsbedarf, eine für Mäuse geeignete Manschette wird erstellt. Diese für Messungen an Mäusen adaptierte Apparatur kam nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz. Die bisher erstellten Aufzeichnungen unterscheiden sich morphologisch kaum voneinander. Durch die Möglichkeit induzierte Aktionspotentiale mit der neuen Elektrode zu messen, wird dann auch eine eingehendere und nicht so sehr von Artefakten beeinflußte Datenerhebung möglich, um die elektrophysiologischen Unterschiede zwischen Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Mutante und Wildtyp klarer aufzuzeigen.

Die Bestimmung der maximalen isometrischen tetanischen Kraft wird einen weiteren Einblick in die muskuläre Situation in der Myf5<sup>ΔloxP/ΔloxP</sup>Maus bringen (Warren *et al.*, 1994; 1996). Da die Muskulatur histologisch und in Bezug auf molekulare Marker weitgehend unauffällig erscheint, mutante Mäuse jedoch eine auffällige Körperhaltung und eingeschränkte Motilität entwickeln, liegt eine Schwächung oder aber funktionale Einschränkung des Bewegungsapparates vor. Die Ursachen hierfür sind noch nicht ausreichend geklärt, eine detailliertere Beschreibung der Eigenschaften der isolierten Muskulatur scheint aufschlußreich, da das Skelett ausschließlich sekundäre Veränderungen aufwies.

#### 7.6 Zukünftige Perspektiven für konditionale Geninaktivierung

Eine Zukunftsversion der Medizin stellt die Gentherapie dar. Die Möglichkeit genetische Fehler komplementierend oder substituierend im heranwachsenden oder adulten Organismus zu therapieren ist vielversprechend. Benötigt werden sichere Vektoren zum gezielten und effizienten Transport der heilenden DNS in die Zielzellen, sowie induzierbare Systeme mit dem Ziel der externen Expressionskontrolle. Die gezielte durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination stellt eine innovative Technologie dar, die als genetischer Schalter eingesetzt werden kann (Nagy A., 2000). Doch die Anwendbarkeit des Cre/loxP-Systems wird durch die vermittelte chromosomale Instabilität eingeschränkt, welche durch das Vorhandensein mehrerer loxP-Erkennungssequenzen im Säugergenom hervorgerufen wird (Lewandoski and Martin, 1997). Die ausschließliche Gefahr besteht nicht in der von der Cre-Rekombinase vermittelten Rekombination zwischen den identischen loxP-Sequenzen. In Folge starker Cre-Rekombinaseexpression werden Verlust, Inversion oder Brüche von Chromatiden sowie ringförmige oder dizentrische Chromosomen nebst zusätzlichen Mikronuklei beobachtet (Loonstra *et al.*; 2001). Die betroffenen Zellen arretieren im Zellzyklus zwischen G<sub>2</sub>- und M-Phase mit einem DNS-Gehalt der größer oder gleich dem vierfachen Chromosomensatz ist. Diese Situation könnte dann zu einer erhöhten Apoptoserate führen und für den toxischen Effekt von Cre-Rekombinase verantwortlich zeichnen (De Alboran *et al.*; 2001; Silver *et al.*; 2001).

In Säugergenomen lassen sich kryptische loxP-Sequenzen identifizieren (Thyagaranian *et al.;* 2000). Bei männlichen Mäusen kann Cre-Rekombinaseexpression in sich entwickelnden Spermien zu Sterilität führen, da zwischen kryptischen loxP Sequenzen chromosomale Umlagerungen in großem Ausmaß induziert werden (Schmidt *et al.;* 2000). Einige dieser der ursprünglichen loxP-Sequenz homologen Basenabfolgen lassen eine durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination mit unverminderter Effizienz zu. Die Cre-Rekombinase benötigt nur 8 bis 10 Basen, die komplementär zu den 13 Basen der palindromischen loxP-Bereiche sind, um eine erfolgreiche Rekombination durchzuführen (Abremski *et al.;* 1985; Abremski *et al.;* 1988). Die therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten im humanmedizinischen Bereich werden hierdurch stark eingeschränkt. Im Vorhandensein kryptischer loxP-homologer Sequenzen steckt auch ein Potential für gentherapeutische gezielte Integrationen ins humane Genom (Thyagaranian *et al.;* 2000).

Eine Vielzahl von sequenzspezifischen Rekombinasen ist identifiziert worden, welche potentiell auch für genomische Rearrangements zur Verfügung stehen. Flpe eine optimierte Flp-Rekombinase stellt eine Alternative zur Cre-Rekombinase dar (Buchholz *et al.*,1998; Buchholz *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2000). Die durch *in vitro*-Evolution aus der Cre-Rekombinase hervorgegangene Fre-Rekombinase weist in eine neue Richtung, der Maßanfertigung benötigter Rekombinasen (Buchholz *et al.*, 2001). Die von der Fre-Rekombinase erkannten und rekombinierten Sequenzen sind zuvor im Mausgenom identifiziert worden. Sukzessive wurde eine Mutagenese der Sequenzspezifität von den loxP-Sequenzen zu den neuen Erkennungssequenzen vorgenommen (Slipe = Substrate linked protein evolution). Es besteht also die Möglichkeit Rekombinasen für den jeweiligen Anwendungszweck zu mutagenisieren, die dann in der Lage sind neue Sequenzen zu erkennen und zu rekombinieren.

Induzierbare Expressionssysteme zur gezielten räumlichen und zeitlichen Kontrolle eines Rekombinationsereignisses sind zukünftig von großem Interesse. Im Fall eines konventionellen Nullallels kann während der Embryogenese über einen längeren Zeitraum eine Adaptation an die Abwesenheit eines Genprodukts auftreten. Im Gegensatz zu dieser Situation kann ein kurzfristiges Wegfallen oder Zuschalten eines Gens bzw. dessen Produktes in einem neuen und völlig anderen Phänotyp enden. Eine derartige schnelle Änderung der genetischen Situation entspricht auch eher einem gentherapeutischen Eingriff und zeigt wie ein Organismus systemisch auf die neue innere Konstellation reagiert. Hormoninduzierbare Rekombinasen wie Cre-ER sind ein geeignetes Werkzeug, um derartige Ziele zu verfolgen (Vooijs *et al.*, 2001).

## 7.7 Die Analyse der Myf5<sup>FGF6ki</sup>Mauslinie

Die Analyse der Myf5<sup>FGF6ki</sup>Mauslinie blieb aus Zeitgründen unbefriedigend lückenhaft. So konnte mittels Wholemount *in-situ*-Hybridisierung nicht eindeutig die ohne frühe Myotombildung ektopisch verlaufende FGF6-Expression aufgezeigt werden. Die fehlerfreie Ausbildung eines Brustkorbs kann nicht als Indikator für die Funktion des Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allels herangezogen werden, da in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, dass die Abwesenheit von Myf5-Protein keinen Einfluß auf die embryonale Rippenentwicklung hat. Ein etwaiger positiver Einfluß der vermittelten FGF6-Expression auf die Rippenentwicklung ist somit schwer nachweisbar. Andererseits wird die Unabhängigkeit der Induktion des Rippenblastems von Myf5 und den von ihm aktivierten Genen klar aufgezeigt. Die von Grass *et al.* postulierte Induktion der Rippenbildung, die vom diffusiblen FGF6-Protein im benachbarten Sklerotom vermittelt werden sollte, kann ausgeschlossen werden, da in Myf5<sup>AloxP/AloxP</sup>Mäusen die frühe Myotomdeterminierung unterbleibt und somit die FGF6-Expression erst vom später in der Embryogenese auftretenden MyoD-Protein aktiviert wird (Grass *et al.*, 1996). Das postulierte Zeitfenster für die fehlerfreie von Myf5-Expression abhängige Induktion eines Rippenblastems ist zu diesem Entwicklungsstadium (E 10.0 *p.c.*) schon geschlossen. Ein indirekter Nachweis der Funktionalität des Myf5<sup>FGF6ki</sup>Allels ist die auftretende vermutlich perinatale Letalität homozygoter Tiere. Wenn die frühe vom Myf5-Lokus vermittelte Expression einen Einfluß auf die Ausbildung oder Aufrechterhaltung der somitomalen Achsen hätte, so wäre die Ursache für die beobachtete Letalität einfach zu verstehen. Im Zusammenhang mit einigen Myf5-Knock-in-Allelen sowie wenigen MRF-Knock-outs werden nur geringe Deformationen des Brustkorbs oder nur einiger Rippen beschrieben, die dann völlig unerwartet in perinataler Letalität enden. Eine unzureichende Determinierung oder Beibehaltung der Identität somitomaler Strukturen wäre auch in diesen Fällen eine mögliche Ursache für das sofortige Eintreten des Todes im Anschluß an die Geburt. Nicht die angenommenen Rippenfehlbildungen als vielmehr das Versagen anderer Strukturen, wie z.B. die fehlerhafte Innervation der Muskulatur wären dann ursächlich für die perinatale Letalität. Möglicherweise wird FGF6 ektopisch im ZNS exprimiert, wie es für das Myf5-Transkript beschrieben wurde (Tajbakhsh and Buckingham, 1995). Die Anwesenheit von FGF6-Protein im sich entwickelnden ZNS könnte Fehlentwicklungen zur Folge haben, die dann in der beobachteten perinatalen Letalität resultieren. Die eingehendere Untersuchung anderer Gewebe in Embryonen, als nur die makroskopische Betrachtung von Skelettmuskulatur und Brustkorb kann Aufschluß über die bisher ungeklärten Ursachen der perinatalen Letalität geben.

## 8 Tagungsbeiträge und Publikationen

### 8.1 Tagungsbeiträge

- Poster: Markus Köster, Axel Kaul and Thomas Braun: Establishment of a cell-type specific and conditional active recombination system in mice in vivo (Vortrag im Rahmen eines Workshops) 12. Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie, Köln 1997
- 21-26 Mai 2000 Poster: Different phenotypes of Myf5-*knock-out's* and *knock-in's* Axel Kaul, Markus Köster, Herbert Neuhaus und Thomas Braun. Kongress: Molecular Biology of Muscle Development and Disease Asilomar /Monterey/Kalifornien, USA.
- 22.08.-26.08.2001 Vortrag: A new Myf-5 allele leads to complete loss of early myotome formation, but shows no effect on rib development. Axel Kaul und Thomas Braun; Heidelberg: Mouse Molecular Genetics Meeting 2001.

### 8.2 Publikation

July 2000 Kaul A., Koster M., Neuhaus H., Braun T. Myf-5 revisited: loss of early myotome formation does not lead to a rib phenotype in homozygous Myf-5 mutant mice. Cell. 2000 Jul 7;102(1):17-9.

# 9 Lebenslauf

Name: Geboren: Vater: Mutter: Geschwister:	Axel Kaul 22. November 1968 in Braunschweig Edmund Kaul ‡, Maschinenbau-Techniker Heide Kaul, geb. Klauck, Buchhalterin Iris Winterfeld, Software-Designerin Michael Kaul, Polizeioberkommissar
Schulbildung:	1975 – 1979 Grundschule Heidberg Braunschweig 1979 – 1981 Orientierungsstufe Heidberg Braunschweig 1981 – 1985 Realschule Heidberg Braunschweig 1985 – 1988 Lessing-Gymnasium Braunschweig
Zivildienst:	Oktober 1988 – Mai 1990; als Fahrer im Behindertentransport beim Arbeiter-Samariter-Bund Braunschweig.
Studium:	WS 1990 – SS 1991 Magisterstudium bis zur Zwischenprüfung in Politologie, Philosophie, Mittelalterlicher und Neuer Geschichte an der Technischen Universität Carolo Wilhelmina zu Braun- schweig. WS 1991 – SS 1997 Studium der Biologie mit dem Hauptfach Zell- und Molekularbiologie; Diplomnote: 1.
Diplomarbeit:	Januar – Oktober 1997 bei PD Dr. Dr. Thomas Braun am Institut für Zell- und Molekularbiologie von Prof. Dr. H. H. Arnold der Technischen Universität Carolo Wilhelmina zu Braunschweig. Thema der Arbeit: Entwicklung eines regulierbaren Zellablations systems durch Cre-/Flp-Rekombinase vermittelte Toxinaktivie- rung in Säugerzellen.
Doktorarbeit:	Februar 1998 – Dezember 2001 bei Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Braun. Wechsel von Braunschweig zur Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg im Februar 1999. Thema der Arbeit: Analyse des Phänotyps Myf-5 mutanter Mäuse nach konditioneller Geninaktivierung.
Tierversuchserlaubnis:	Juni 2000 Genehmigung für die Beantragung und Durchführung von Tierversuchen.
Beschäftigung:	Oktober 1989 – März 1999: freiberuflicher Musiklehrer an der Musikschule Music-Point in Braunschweig.
	Seit April 2002 angestellt als Business Development Manager bei der Gene Bridges GmbH in Dresden.
Dradon 12 Mar 2002	

Dresden, 12. März 2003

网络巴

## 10 Danksagung

Ich möchte mich zu allererst bei den Mäusen für ihre sprichwörtlich aufopferungsvolle Mitarbeit bedanken. Ohne sie wäre die vorliegende Arbeit niemals zustande gekommen. Sie haben wertvolle Einblicke in die Komplexität der Regulation der Myogenese und Muskelregeneration geliefert, die vielleicht eine Tages in der Heilung von Krankheiten des Menschen genutzt werden können.

Ich möchte der Prüfungskommission danken und im Speziellen Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Braun für die Betreuung der Arbeit und den Korreferenten Prof. Dr. Jockusch (jetzt auch mit "C") und Prof. Dr. med. Viebahn.

Da die Arbeit in 2 verschiedenen Städten erstellt wurde, möchte ich hier die Gelegenheit nutzen und chronologisch richtig erst der AG Arnold in Braunschweig danken.

#### **Braunschweig:**

Als da zu nennen wären die unvergleichliche Charlotte Klaue für ihr teilweise unbemerktes Wirken hinter verschlossener Tür. Dr. "MSK mit freundlichen Grüßen …", Dr. Thomas Flop, Astrid Grudziecki, Lore für allgegenwärtigen Hochglanz und eine Mindeststrenge <sup>(3)</sup>

AG Jockusch für Weihnachtsfeiern und nette Kollegen.

Prof. Dr. Hans Henning Arnold

Dr. Karsten Ragge, Dr. Christian, Ines, Alex (Leipzig war ein super Tip), Sonja B., Iris, Dr. Olli, Dr. Heike, Cristina Dr. Sonnenschein, Dr. Thomas Brand, Dr. Robert, Dr. Birgit Andree, Dr. André, Dr. Astrid B., homo ludens: Dr. Klaus Seidel, Dr. Angela, Dr. Andrea S., Rambi, 12-Jahre Petra, Dr. Thorsten, Dr. Silke, Dr. Barbara, Nix-Doc Pia.

Steffi Willenzon für den über alle Maßen aufopferungsvollen Einsatz und die hervorragende Betreuung in allen Lebenslagen.

P. für alles und für die Glühwürmchenhypothese, an die ich glaube. Christine Kurpitz für eine kurze furiose Zeit.

#### Halle:

Prof. Dr. Dr. Thomas Braun für seine über allen Maßen kompetente wissenschaftliche Betreuung und die vielen Jahre die ich in seinen Labors verbringen durfte. Ich danke ihm weiter für jegliche Unterstüzung in Form von finanziellen Mitteln, Plasmiden, Mauslinien, der Blastozysteninjektion, die in der Mauslinie Myf5<sup>FGF6ki</sup> gipfelte und vielem mehr.

Die unglaublich netten Neuhäuser aus USA (jetzt sind's schon 3!) - mit Petra im Rücken zu arbeiten vermisse ich doch sehr! Herbert für seinen Einsatz bei der Übersetzung dieser Arbeit in Deutsche <sup>©</sup>. Turbodiplomandin Julia nicht nur fürs Open-Air-Kino, Future-Cardiologist Dr. Henning, Zahn-Pre-Doc Nadine.

Konspi schwarze Fee – bald auch Dr. Schläfer.

Yvonnchen, Undine, Katja, Sonja, Marcus, Dr. Menne, der russian invasion: Sveta und Olesya, der restlichen Ostfront: Manja, Ivan, Eva, Tomek, Claudia, den Mausfrauen: Frau Zorn und Frau Trapp. Des Südfront: bayuvarian Max, Fikru dafür dass er auch nachts ganzen Einsatz zeigt (!).

Annlies, Annett, Dagobert, Dr. Laube, Christine (wech war sie), Frau Dr. Fricke für ihren strahlenden Einsatz, Dr. Jazz Weber, AG-Weber <sup>©</sup> - ich verstecke auch keine Zentrifuge wieder! Prof. Dr. Lasch für seine gelungenen Reden.

Frau Gabriele Liebert-Hoang für den Kampf im Sekretariat mit und gegen das Chaos <sup>©</sup>. Ich würde doch nie jemanden um den Finger wickeln <sup>©</sup>.

Dr. Gert Hause und Frau Franke für die Arbeit am painstacking Elektronenmikroskop. Dr. Kornhuber für den Eintritt in die Welt der Neurologie und seine mausoffene Art <sup>(2)</sup>. Die Nachtwächter! Da kann einem echt nix passieren! (wenn man nicht gerade erschreckt wird)

Moni dafür, dass sie fast bis zum Ende durchgehalten hat - fast!

#### Der Rest der Welt:

Susanne Töllners Rettung aus Spanien "... weil wir fast ertrunken wären ...."

Andreas Kirstein, Marcus und Nanni Zöllkau, Bettina Kühne, Hannes und Simone Schlender alle mir ans Herz gewachsenen Komilitonen. Marek Mösche und Lourdes. Sra. J.L.M.©

Gisele Giannocco por estar gisgian e muitos beijos pra mim! Uma grande beleza exceptional. Nao esqueci nada minha coracao.

Sony: für einen Computer der fast nie abstürzt. Renault für fast grenzenlose Mobilität (R21).

Offene JazzHaus Schule Köln, die mich davon abgebracht hat mit einem Musikstudium zu liebäugeln, sonst wäre diese Arbeit vermutlich nicht zustande gekommen. Musikschule Musikpoint für 9,5 Jahre kontinuierliches Einkommen und meinen Schülern, dass sie mich soviel gelehrt haben. Bernd Flentge danke ich für sein Vertrauen und seine Kollegialität, der BigBand für die vielen lustigen Stunden.

Ich möchte mich bei den Gitarrenbauern bedanken deren Kunstwerke mich nie loslassen: Atze Rockinger, Paul Reed Smith, K. Yairi, Leo Fender, und den Meistern von Ibanez, Hamer USA und Yamaha. Nicht vergessen werden sollte die kleine Steinberger Spirit.

Ich möchte meiner Familie danken, dafür dass immer alle da waren wenn ich sie gebraucht hab. Meinen Eltern Edmund und Heide Kaul, sowie meinen Geschwistern Iris Kaul und Michael Kaul. Natürlich auch ihren Familien: Andrea, Marvin und Gerrit, sowie Thomas Winterfeld. Danken möchte ich auch meinen verstorbenen Großeltern, die auch ihren Teil zum Zustandekommen dieser Arbeit geleistet haben. Ich danke des weiteren auch meinen Tanten und Onkeln, sowie deren F1- und F2-Generationen mit denen ich das eine oder andere Wochenende verbracht hab.

Ich möchte der Sonne danken, dass sie immer wieder Lichtblicke aussendet und an die Erdenbewohner verschenkt. Svenja möchte ich danken für das was kommt, denn es wird gut!

### 11 Literaturverzeichnis

Abremski K. and Hoess R. (1985): Phage P1 Cre-loxP site-specific recombination. Effects of DNA supercoiling on catenation and knotting of recombinant products. J. Mol. Biol. 184, 211-220.

Abremski K.; Frommer B.; Wierzbicki A. and Hoess R.H. (1988): Properties of a mutant Cre protein that alters the topological linkage of recombination products. J. Mol. Biol. 202, 59-66.

Ahn A.H. and Kunkel L.M. (1993): The structural and functional diversity of dystrophin. Nat. Genet. 3, 283-291.

de Alboran M.; O'Hagan I.; Gärtner R.C.; Malynn F.; Davidson B.; Rickert L., Rajewski K.; De-Pinho R.A. and Alt F.W. (2001). Immunity 14, 45-55.

Allamand V and Campbell K.P. (2000): Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. Hum. Molecular Genetics, Vol. 9 (16), 2459-2467.

Allen D.L.; Sartorius C.A.; Sycuro L.K. and Leinwand L.A. (2001): Different Pathways Regulate Expression of the Skeletal Myosin Heavy Chain Genes. JCB, Manuscript M108017200.

Anderson J.E.; Ovalle W.K. and Bressler B.H. (1987): Electron microscopic and autoradiographic characterization of hindlimb muscle regeneration in the mdx mouse. Anat Rec. 219 (3): 243-257.

Andrés V. and Walsh K. (1996): Myogenin expression, cell cycle withdrawal and phenotypic differentiation are temporally seperable events that precede cell fusion upon myogenesis. J. Cell Biol. 132, 657-666.

Appell H.J.; Forsberg S.; Hollmann W. (1988): Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neoformation. Int J Sports Med. 1988 Aug; 9 (4): 297-329.

Ausubel F.R. and Brent S.K. (1992): Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associated and Wiley Interscience Volume 1 and 2.

Asakura A.; Komaki M.; Rudnicki M. (2001): Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation.Differentiation 68 (4-5): 245-253.

Arendt K.-W.; Asmussen G. (1974): Die Anzahl und die Verteilung von Muskelspindeln im M. triceps surae der Ratte, Anat. Anz. Bd. 136: 207-216.

Bladt F.; Riethmacher D.; Isenmann S.; Abuzzi A.; and Birchmeier C. (1995): Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. Nature 376, 768-771.

Boström H.; Willetts K.; Pekny M.; Levéen P.; Lindahl P.; Hedstrand H.; Pekna M.; Hellström M.; Gebre-Mehdin S.; Schalling M.; Nillson M.; Kurland S.; Törnell J.; Heath J.K. and Betsholtz C. (1996): PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. Cell 85, 863-873.

Brohmann H.; Jagla K. and Birchmeier C. (2000): The role of lbx1 in migration of muscle precursor cells. Development 127, 437-445.

Bischoff R. (1986): Proliferation of muscle satelliet cells in intact myofibres in culture. Dev. Biol. 115, 129-139.

Bischoff R. and Heintz C. (1994): Enhancement of skeletal muscle regeneration. Dev. Dyn 201, 41-54.

Borycki A.-G.; Mendham L. and Emerson C.P. (1998): Control of somite patterning by Sonic hedgehog and ist downstream signal response genes. Development 126, 1665-1674.

Borycki A.-G.; Brunk B.; Tajbakhsh S. Buckingham M.; Chiang C. and Emerson C.P. (1999): Sonic hedgehog controlls epaxial muscle determination through *Myf5* activation. Development 126, 4053-4063.

Braun T.; Bober E.; Buschhausen-Denker G.; Kohtz S.; Grzeschik K.H. and Arnold H.H. Braun (1989a): Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf5 gene products [Veröffentlichte Korrektur erschien in EMBO J. 1989 Dec; 8 (13): 4358]. EMBO J. 8, 3617-3625.

Braun T.; Buschhausen-Denker G.; Bober E.; Tannich E. and Arnold H.H. (1989b): A novel human muscle factor related but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. EMBO J. 15, 310-318.

Braun T.; Winter B.; Bober E. Arnold H.H. (1990): Transcriptional activation domain of the muscle-specific gene-regulatory protein myf5. Nature 346, 663-665.

Braun T.; Bober E.; Arnold H.H. (1992): Inhibition of muscle differentiation by the adenovirus E1a protein: repression of the transcriptional activating function of the HLH protein Myf-5. Genes Dev., May;6 (5): 888-902.

Braun T.; Rudnicki M.A.; Jaenisch R.; Arnold H.H. (1992): Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. Cell; 71 (3): 369-82.

Braun T.; Rudnicki M.A.; Arnold H.H. (1994): ES-cells carrying two inactivated Myf-5 alleles form skeletal muscle cells: Activation of an alternative Myf-5-independent differentiation pathway. Dev. Biol. 164, 24-36.

Braun T.; Bober E.; Rudnicki M.A.; Jaenisch R.; Arnold H.H. (1994): MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice. Development; 120 (11): 3083-3092.

Braun T.; Arnold H.H. (1994): ES-cells Carrying Two Inactivated myf-5 Allels from Skeletal Muscle Cells: Activation of an Alternative myf-5-Independent Differentiation Pathway. Developmental Biology 164, 24-36.

Braun T.; Arnold H.H. (1995): Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. EMBO J. Mar 15;14 (6): 1176-1186.

Brüning J.C.; Michael M.D.; Winnay J.N.; Hayashi T.; Hörsch D.; Accili D.; Goodyear L.J.; Kahn C.R. (1998): A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. Molecular Cell 2, 559-569.

Buchholz F.; Angrand P.O.; Stewart A.F. (1998): Improved properties of Flp-recombinase evolved by cycling mutagenesis. Nat. Biotechnol. 16, 657-662.

Buchholz F, Refaeli Y, Trumpp A, Bishop JM. (2000): Inducible chromosomal translocation of AML1 and ETO genes through Cre/loxP-mediated recombination in the mouse. EMBO Rep, 1 (2): 133-139.

Buchholz F and Stewart A.F. (2001): Alteration of Cre recombinase site specificity by sustratelinked protein evolution. Nat. Biotec., 19, 1047-1052.

Buckingham M (2001): Skeletal muscle formation in vertebrates. Current opinion in Genetics & Development 11, 440-448.

Bulfield G.; Siller W.G.; Wight P.A. abd Mooore K.J. (1984): X-Chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1189-1192.

Carlson B.M. (2001): Enzyclopedia of Life Sciences: Regeneration of Muscle, (Nature Publishing Group, Macmillan Publishers Ltd. Reg.No.785998 England), http://www.els.net

Carvajal J.J.; Cox D.; Summerbell D. and Rigby P.W.J. (2001): A BAC transgenic analysis of the MRF4/Myf5 locus reveals interdigitated elements that control activation and maintenance of gene expression during muscle development. Development 128: 1857–1858.

Chen J.M. (1952): Studies in the morphogenesis of the mouse sternum. I. Normal embryonic development. J. Anat. 86, 373-386.

Chen J.M. (1953): Studies on the morphogenesis of the mouse sternum. III. Experiments on the closure and segregation of the sternal bands. J. Anat. 87, 130-149.

Chen SL, Loffler KA, Chen D, Stallcup MR, Muscat GE. (2002): The Coactivator-associated Arginine Methyltransferase Is Necessary for Muscle Differentiation. CARM1 Coactivates Myocyte Enhancer Factor-2. J Biol Chem 277 (6): 4324-4333.

Christ B.; Jacob H. and Jacob B. (1978). On the formation of the myotoms in avian embryos. An experimental and scanning electron microscope study. Experientia 34, 514-516.

Christ, B., Brand-Saberi, B., Grim, M. and Wilting, J. (1992). Local signaling in dermomyotomal cell type specification. Anat. Embryol. 186, 505-510.

Christ B. and Ordahl C.P. (1995): Early stages of chick somite development. Anat Embryol (Berl.) 191, 381-396.

Chevalier A.; Kieny M.; Mauger A. and Sengel P. (1977): Developmental fate of the somitic mesoderm in the chick embryo. In Vertebrate limb and Somite Morphogenesis (ed. D.A. Ede, J.R. Hinchliffe and M. Balls) pp. 421-431. Cambridge University Press, Cambridge.

Cinnamon Y.; Kahane N. and Kalcheim C. (1999): Characterization of the early development of specific hypaxial muscles from the ventrolateral myotome. Development 126, 4305-4315.

Cohn M.J.; Izpisua-Belmonte J.C.; Abud H.; Heath J.K. and Tickle C. (1995): Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. Cell 80, 739-746.

Cooper R.N.; Tajbakhsh S.; Mouly V.; Cossu G.; Buckingham M and Browne G.S. (1999): In vivo satellite cell activation vio Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. Journal of Cell Science 112, 2895-2901.

Cornelison D.D.W.; Olwin B.; Rudnicki M.A.; Wold B. (2000): MyoD-/- Satellite cells in Single-Fiber Culture Are Differentiation Defective and MRF4 Deficient. Developmental Biology 224, 122-137. Cornelison D.D.; Filla M.S.; Stanley H.M.; Rapraeger A.C.; Olwin B.B. (2001): Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. Dev Biol. 239 (1): 79-94.

Cossu G.; Kelly R.; Tajbakhsh S.; Di Donna S.; Vivarelli E. and Buckingham M. (1996): Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. Development 122, 429-437.

Crescenzi M.; Fleming T.; Lassar A. and Weintraub H. (1990): MyoD induces growth arrest independent of differentiation in normal and transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8442–8446.

Csete M.; Walikonis J.; Slavny N.; Wie Y.; Korsnes S.; Doyle J.C. and Wold B. (2001): Oxygen-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Satellite Cell Proliferation and Adipogenesis in Culture. J. of Cellular Physiology 189: 189-196.

Cupelli L., Renault B.; Leblanc-Straceski J., Ward D., Kucherlapati R.S., Krauter K. (1996): Assignment of the human myogenic factors 5 and 6 (MYF5, MYF6) gene cluster to 12q21 by in situ hybridization and physical mapping of the locus between D12S350 and D12S106,Cytogenet Cell Genet. 72 (2-3): 250-251.

Cusella-De Angelis M.G.; Lyons G.; Sonnino C.; De Angelis L.; Vivarelli E. Farmer K. et al. (1992): MyoD, myogenin independent differentiation of primordial myoblasts in mouse somites. J. Cell Biol. 116, 1243-1255.

Daubas P.; Tajbakhsh S.; Hadchouel J.; Primig M. and Buckingham M. (2000): Myf5 is a novel early axonal marker in the mousebrain and is subjected to post-transcriptional regulation in neurons. Development 127, 319-331.

Davis R.L.; Weintraub H. and Lassar A. (1987): Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell 51, 987-1000.

DeLapeyrière O.; Rosnet O.; Benharroch D.; Raybaud F.; Marchetto S.; Planche J.; Galland F.; Mattéi M.-G.; Copeland N. G.; Jenkins N. A.; Coulier F. and Birnbaum D. (1990): Structure, chromosome mapping and expression of the murine Fgf-6 gene. Oncogene 5, 823-831.

DeLapeyrière O.; Ollendorff V.; Planche J.; Ott M.O.; Pizette S.; Coulier F. and Birnbaum D. (1993): Expression of the *Fgf6* gene is restricted to developing skeletal muscle in the mouse embryo. Development 118, 601-611.

Dent J.A.; Polson A.G. and Klymkowski M.W. (1989): A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in Xenopus. Development 105, 61-74.

Dhoot G.K.; Gustafsson M.K.; Ai X.; Sun W.; Standiford D.M.; Emerson C.P. Jr. (2001): Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. Science 293 (5535): 1663-1666.

Edmondson D.G. and Olson E.N. (1989): A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program [Veröffentlichte Korrektur erschien in Genes Dev 1990 Aug; 4 (8): 1450]. Genes Dev 3, 628-640.

Erlebacher A.; Filvaroff E.H.; Gitelman S.E. and Derynck R. (1995): Towards a molecular understanding of skeletal development. Cell 80, 371-378.

Fang J.; Hall B.K. (1997): Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periostea, Anat Embryol 196, 349-362 (Springer-Verlag).

Feinberg A.P. and Vogelstein B. (1983): Technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Analyt. Bioc. 132, 6-13.

Fiering S.; Epner E.; Robinson K.; Zhuang Y., Telling A.; Hu M.; Martin D.I. Enver T., Ley T.J. and Groudine M. (1995): Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. Genes Dev. 9, 2203-2213.

Floss T.; Arnold H.H.; Braun T. (1996): Myf5(m1)/Myf-6(m1) compound heterozygous mouse mutants down-regulate Myf-5 expression and exert rib defects: evidence for long-range cis effects on Myf-5 transcription. Dev Biol 174, 140-147.

Floss T.; Arnold H.H.; Braun T. (1997): A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. Genes Dev. Aug 15;11 (16): 2040-2051.

Friedrich G. and Soriano P. (1991): Promoter traps in embryonic stem cells: A genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. Genes Dev. 5, 1513-1523.

Garry D.J.; Yang Q.; Bassel-Duby R. and Williams R.S. (1997): Persistent expression of MNF identifies myogenic stem cells in postnatal muscles. Dev. Biol. 188, 280-294.

Garry D.J.; Meeson A.; Elterman J.; Yang P.; Bassel-Duby R. and Williams R.S. (2000): Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. PNAS USA 97, 5416-5412.

Gerber A.N.; Klesert A.R.; Bergstrom D.A. and Tapscott S.J. (1997): Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis. Genes Dev. 11, 436-450.

Gerhart J.; Bast B.; Neely C.; Iem S.; Amegbe P.; Niewenhuis R.; Miklasz S.; Cheng P.F.; George-Weinstein M. (2001): MyoD-positive myoblasts are present in mature fetal organs lacking skeletal muscle. J Cell Biol 155 (3): 381-392.

Glotzer M.; Murray A.M. and Kirschner M.W. (1991): Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature 349:132–138.

Goldfarb M. (1990). The fibroblast growth factor family. Cell Growth Diff. 1, 439-445.

Grass S.; Arnold H.H.; Braun T. (1996): Alterations in somite patterning of Myf-5-deficient mice: a possible role for FGF-4 and FGF-6. Developmnet 122, 144-150.

Grounds M.D.; Yablonka-Reuveni Z. (1993): Molecular and cellular biology of muslce regeneration. In Molecular and cellular biology of muscluar dystrophy (ed. T. Partridge) Chapman and Hall London UK, 210-256.

Gu H.; Zou Y.R.; Rajewski K. (1993): Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. Cell 73, 1155-1164. Hadchouel J.; Tajbakhsh S.; Primig M.; Chang T.H.; Daubas P.; Rocancourt D. and Buckingham M. (2000): Modular long-range regulation of Myf5 reveals unexpected heterogeneity between skeletal muscles in the mouse embryo. Development 127, 4455-4467.

Han K.J. and Martin G.R. (1993): Embryonic expression of FGF-6 is restricted to the skeletal muscle lineage. Dev. Biol. 158, 549-554.

Harris, A.J.; Duxson M.J.; Fitzsimons R.B. and Rieger F. (1989a): Myonuclear birthdates distinguish the origins of primary and secondary myotubes in embryonic mammalian skeletal muscles. Development 107, 771-784.

Henderson D.J.; Conway S.J. and Copp A.J. (1999): Rib truncations and fusions in the Sp2H mouse reveal a role for Pax3 in specification of the ventro-lateral and posterior parts of the somite. Dev. Biol. 209, 143-158.

Hogan B.; Constantini F.; Lacy E (1994): Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual. New York: Cold Spring Habour Laboratory, 151-205.

Horan G.S.B.; Wu K.; Wolgemuth D.J. and Behringer R.R. (1994): Homeotic transformation of cervical vertebrae in Hoxa-4 mutant mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12644–12648.

Horlick R.A.; Stack S.L. and Cooke G.M. (1992): Cloning, expression and tissue distribution of the gene encoding rat fibroblast growth factor receptor subtype 4. Gene 21;120 (2):291-295

Jabs E.W.; Xi X.; Scott A.F.; Myers G.; Chen W.; Eccles M.; Mao J.; Charnas L.R.; Jackson C.E. and Jaye M. (1994): Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast grrowth factor receptor 2. Nature Genet. 8, 275-279.

Kablar B.; Krastel K.; Ying C.; Asakura A.; Tapscott S.J.; Rudnicki M.A. (1997): MyoD and Myf5 differentially regulate the development of limb versus trunk seletal muscle. Development 124, 4729-4738.

Kaufmann M.H. (1992): The Atlas of Mouse Development, Cambridge (Academic Press Limited).

Kaul A.; Köster M.; Neuhaus H.; Braun T. (2000): Myf-5 Revisited: Loss of Early Myotome Formation Does Not Lead to a Rib Phenotype in Homozygous Myf-5 Mutant Mice. Cell, Vol. 102, 17-19.

Kaushal S.; Schneider J.W.; Nadal-Ginard B. and Mahdavi V. (1994): Activation of the myogenic lineag ny MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. Science 266, 1236-1240.

Kegley K.M.; Gephart J.; Warren G.L. and Pavlath G.K. (2001): Altered Primary Myogenesis in NFATC32/2 Mice Leads to Decreased Muscle Size in the Adult. Developmental Biology 232, 115-126.

Kelly, A. M., and Zacks, S. I. (1969). The histogenesis of rat intercostal muscle. J. Cell. Biol. 42, 135-153.

Keynes R. and Stern C. (1988): Mechanisms of vertebrate segmentation. Development 103, 413-429.

Kieny M.; Patou M.; Chevallier A.; and Mauger (1986). Spatialorganization of the developing limb musculature in birds and mammals. Bibl. Anat. 29, 65-90.

Kitzmann M. and Fernandes A. (2001): Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. CMLS 58, 571-579.

Kostic D. and Capecchi M.R. (1994): Mech. Dev. 46, 231-247.

Köster M. (1999): Konditionelle Genausschaltung in der Maus: Effektive Steuerung durch ein kombiniertes Regulationssystem. Doktorarbeit Braunschweig (Fachbereich 9).

Krämer W. (1999): Wie schreibe ich eine Seminar- oder Examensarbeit?, (2. Auflage), Frankfurt/Main (Campus Verlag).

Kruger M.; Mennerich D.; Fees S.; Schafer R.; Mundlos S.; Braun T. (2001): Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. Development; 128 (5): 743-752.

Kühn R.; Schwenk F.; Aguet M.; Rajewsky K. (1995): Inducible gene targeting in mice. Science, 269, 1427-1429.

Lai E.; Clark K.L.; Burley S.K. and Darnell J.E. (1993): Hepatocyte nuclear factor/fork head or winged helix proteins: a family of transcription factors of diverse biologic function. PNAS USA 90, 10421-10423.

LeMotte P.K., Kuroiwa A.; Fessler L.I. and Gehring W. (1989): The homeotic gene Sex Combs Reduced of Drosophila: gene structure and embryonic expression. EMBO Journal 8 (1), 219-227.

Lewandoski M. and Martin G. R. (1997): Cre-mediated chromosome loss in mice. Nat. Genet. 17, 223-225.

Li L.; Zhou J.; James G.; Heller-Harrison R.; Czech M.P. and Olson E.N. (1992):FGF inactivates myogenic helix-loop-helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase C site in their DANN-binding domains. Cell 71, 1181-1194.

Liebermann D.E. (2001): Musculoskeletal System – Overview, (Nature Publishing Group, Macmillan Publishers Ltd. Reg.No.785998 England), http://www.els.net/els/els/article/article view.html?artid=A0001858&sessionid

Lindon C.; Montarras D. and Pinset C. (1998): Cell Cycle-regulated Expression of the Muscle Determination Factor Myf5 in Proliferating Myoblasts. Journal of Cell Biology 140, 111-118.

Lindon C.; Albagli O.; Domeyne P.; Montarras D. and Pinset C. (2000): Constitutive Instability of Muscle Regulatory Factor Myf5 Is Distinct from Its Mitosis-Specific Disappearance, Which Requires a D-Box-Like Motif Overlapping the Basic Domain. Molecular and Cellular Biology, 8923-8932.

Lindon C.; Albagli O.; Pinset C.; Montarras D. (2001): Cell Density-Dependent Induction of Endogenous Myogenin (myf4) Gene Expression by Myf5. Dev Biol. 240 (2): 574-584.

Loonstra A.;Vooijs M.; Beverloo H.B.; Al Allak B.; van Drunen E.; Kanaar R.; Berns A. and Jonkers J. (2001): Growth inhibition and DNA damage induced by Cre-recombinase in mammalian cells.PNAS 98 (16), 9209-9214.

Lobe C.G.; Koop K.E.; Kreppner W.; Lomeli H.; Gertsenstein M.; Nagy A. (1999): Z/AP, a Double Reporter for Cre-Mediated Recombination. Developmental Biology 208, 281-292.

Ludolph D.C. and Konieczny S.F. (1995): Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. FASEB J. 9, 1595-1604.

Lyons G.E.; Mühlebach S., Moser A., Masood R, Paterson B.M., Buckingham M.E. and Perriard J.-C. (1991): Developmental regulation of creatine kinase expression by myogenic factors in embryonic mouse and chick skeletal muscle. Development 113, 1017-1029.

Mak K.L.; To R.Q.; Kong Y. and Konieczny S.F. (1992): The MRF4 activation domain is required to induce muscle-specific gene expression. Mol Cell Biol 12, 4334-4336.

Marics L.; Adelaide J.; Raybaud F.; Mattai M.G. (1989): Characterisation of the Hst-1 related FGF-6 gene, a new member of the fibroblast growth factor family. Oncogene 4, 335-340.

McBurney M.W.; Sutherland L.C.; Adra C.N.; Leclair B.; Rudnicki M.A. and Jardine K. (1991): The mouse PGK-1 gene promoter contains an upstream activator sequence. Nucl. Acid Reserach 19, 5755-5761.

McGann C.J.; Odelberg S.J. and Keating M.T. (2001): Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. PNAS vol. 98, no. 24, 13699-13704

McLeod M.J. (1980): Differential staining of cartilage an dbone in whole mouse fetuses by alciane blue and alizarine red. S. Teratol. 22, 299-301.

McPherron A.C. and Lee S.-J. (1997): Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94, 12457-12461.

Megeney L.A.; Kablar B.; Garret K.; Anderson J.E.; Rudnicki M.A. (1996): MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. Genes & Development 10, 1173-1183.

Megeney L.A.; Kablar B.; Perry R.L.S.; Ying C.; May L.; and Rudnicki M.A. (1997): Severe cardiomyopathy in mice lacking dystrophin and MyoD. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96, 220-225.

"Methods in Cell Biology, Vol. 52" Academic Press, 1998. Kapitel 11: "Adenoviral Gene Delivery" von Ragot T.; Oplon P. and Perricaudet M., 229-260.

Miner J.H. and Wold B. (1990): Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. Proc Natl Acad Sci USA 87, 1089-1093.

Molkentin J.D.; Black B.L.; Martin J.F. and Olson E.N. (1995): Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. Cell 83, 1125-1136.

Montarras D. Auradé F.; Johnson T.; Ilan J.; Gross F. and Pincet C. (1996): Autonomous differentiation in the mouse myogenic cell line, C2, involves a mutual positive control between insulin like growth factor II and MyoD, operating as early as the myoblast stage. J. Cell Science 109, 551-560.

Moran J.L.; Levorse J.M. and Vogt T.F. (1999a): Limbs move beyond the radical fringe. Nature 399, 742-743.

Moran J.L.; Johnston S.H.; Rauskolb C.; Bhalerao J.; Bowcock A.M.; Vogt T.F. (1999b): Genomic structure, mapping, and expression analysis of the mammalian Lunatic, Manic, and Radical fringe genes. Mamm Genome, 10 (6): 535-543.

Muenke M.; Schell U.; Hehr A.; Robin N.H.; Losken H.W.; Schinzel A.; Pulleyn L.J.; Rutland P.; Reardon W.; Malcom S. and Winter R.S. (1994): A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. Nature Genet. 8, 269-274.

Myer A. Olson E.N. and Klein W. (2001): MyoD Cannot Compensate for the Absence of Myogenin during Skeletal Muscle Differentiation in Murine Embryonic Stem Cells. Dev. Biol. 229, 240-350.

Nabeshima Y.; Hanaoka K.; Hayasaka M.; Esumi E.; Li S.; Nonaka I. and Nabeshima Y. (1993): Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. Nature *364*, 532–535.

Nagy A. (2000): Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring, genesis 26, 99-109 (Wiley-Liss, Inc.).

Nishi S. (1967): Muskeln des Rumpfes. In *Handbuch der Vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere* Vol. 5 (ed. L. Bolk, E. Göppert. E. Kallius and W. Lubosch) 341-446- A. Asher & Co: Amsterdam.

Niwa H.; Yamamura K. and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108, 193–199.

Olson E.N.; Arnold H.H., Rigby P.W. and Wold B. (1996): Know your neighbors: Three phenotypes in nullmtants of the myogenic bHLH gene MRF4. Cell 85, 1-4.

Ontell M. and Kozeka K. (1984). The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study. Am. J. Anat. 171, 133-148.

Ordahl C.P. and Le Douarin N.M. (1992): Two myogenic lineages within the developing somite. Development 111, 339-353.

Orr-Urtreger, A. and Lonai, P. (1992). Platelet-derived growth factor-A and its receptor are expressed in separate, but adjacent cell layers of the mouse embryo. Development 115, 1045-1058.

Osses N. and Brandan E. (2001): ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression. Am J Physiol Cell Physiol 282 (2): C383-394.

Ott M.O.; Bober E.; Lyons G.; Arnold H.H. and Buckingham M. (1991): Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of sceletal muscle in the mouse embryo. Development 121, 1097-1107.

Patapoutian A.; Yoon J.K.; Miner J.H.; Wang S.; Stark K.; Wold B.(1995): Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. Development 121, 3347-3358.

Peters K.G.; Werner S.; Chen G. and Williams L.T. (1992): Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. Development 114 (1):233-243.

Pham C.T. N.; MacIvor D.M.; Hug B.A.; Heusel J.W.; LevyT.J. (1996): Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. PNAS Vol. 93, 13090-13095.

Rafuse F.V.; Millner L.D. and Landmesser L.T. (1996): Selective innervation of slow and fast muscle regions during early chick neuromuscular development. J. Neurosci. 6864-6877. Ramirez-Solis R.; Zheng II.; Whiting J.; Krumlauf R. and Bradley A. (1993): Hoxb-4 (Hox-2.6) mutant mice show homeotic transformation of a cervical vertebra and defects in the closure of the sternal rudiments. Cell *73*, 279–294.

Reardon W.: Winter R.M.; Rutland P.; Pulleyn L.J.; Jones B.M. and Malcom S. (1994): Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene causes Crouzon syndrome. Nature Genet. 8, 98-103.

Rhodes S.J. and Konieczny S.F. (1989): Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. Genes Dev. 3, 2050-2061.

Ridgeway A.G. and Skerjanc I.S. (2001): Pax3 Is Essential for Skeletal Myogenesis and the Expression of Six1 and Eya2. JBC Vol. 276, No. 22, 19033-19039.

Rijli F.M.; Dolle P.; Fraulob V.; LeMeur M. and Chambon P. (1994): Insertion of a targeting construct in a Hoxd-10 allele can influence the control of Hoxd-9 expression. Dev. Dyn. 201, 366–377.

Rodriguez C.I.; Buchholz F.; Galloway J.; Sequerra R.; Kasper J.; Ayla R.; Stewart A.F.; Dymecki S.M. (2000): High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. Nat. Genet. 25, 139-140.

Rohen J.W.; Yokoshi C. (1993): Anatomie des Menschen: Photographischer Atlas der systematischen und topographischen Anatomie, (3. Auflage), Stuttgard-New York (Schattauer).

Rosenblatt J.D.; Yong D. and Parry D.J. (1994): Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. Muscle Nerve 17, 608-613.

Ross J.J.; Duxson M.J. and Harris A.J. (1987). Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles. Development 100, 383-394.

Rousseau F.; Bonaventure J.; Legeai-Mallet L.; Pelet A.; Rozet J.M.; Maroteaux P.; LeMerrer M.; Munnich A. (1994): Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achon-droplasia. Nature 371, 252-254.

Rousseau F.; Saugier P.; LeMerrer M.; Munnich A.; Delezoide A.L.; Maroteaux P.; Bonaventure J.; Narcy F. and Sanak M. (1995): Stop codon FGFR3 mutations in tanatophoric dwarfism type 1. Nature Genet. 10, 11-12.

Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R. (1992): Inactivation of MyoD in mice leads to upregulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. Cell; 71 (3): 383-390.

Rudnicki M.; Schnegelsberg P.N.; Stead R.H., Braun T, Jaenisch R. (1993): MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. Cell, Dec 31; 75 (7): 1351-1359.

Sabourin L.A.; Girgis-Gabardo A.; Seale P. Asakura A.; Rudnicki M.A. (1999): Reduced differentiation potential of primary MyoD-/- myogenic cells derived from adult skeletal muscle. The Journal of Cell Biology 144, Feb. 12, 631-641.

Sabourin L.A.; Rudnicki M.A. (2000): The molecular regulation of myogenesis. Clinical Genetics 57, 16-25.

Sassoon D.; Lyons G.; Wright W.E.; Lin V.; Lassar A.; Weintraub H. and Buckingham M. (1989): Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. Nature 341, 303-307.

Sauer B. (1998): Inducible gene targeting in mice using the Cre/loxP system. Methods 14, 381-392.

Sauer B. and Henderson N. (1988): Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5166-5170.

Scacheri P.C.; Crabtree J.S.; Novotny E.A.; Garret-Beal L.; Chen A.; Edgemon K.A.; Marx S.J.; Spiegel A.M.; Chandrasekharappa S.C.; Collins F.S. (2001): Bidirectional Transcriptional Activity of PGK-Neomycin and Unexpected Embryonic Lethality in Heterozygote Chimeric Knockout Mice. Genesis 30, 259-263.

Schafer K.; and Braun T. (1999): Early specification of limb precursor cells by homeobox gene Lbx1h. Nat. Genet. 23, 213-216.

Schaft J.; Ashery-Padan R.; van Der Hoeven F.; Gruss P. Stewart A.F. (2001): Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes. Genesis. Sep; 31 (1): 6-10.

Schmidt E.E.; Taylor D.S.; Prigge J.R.; Barnett S. and Capecchi M.R. (2000): Illegitimate Credependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 13702-13707.

Schubert W. (1991): Triple immunofluorescence confocal laser scanning microscopy: spatial correlation of novel cellular differentiation markers in human muscle biopsies. Eur. J. Cell. Biol. Aug 55 (2), 272-285

Schughart, Struve M.; Spoerle R. and Günther T. (31.01.97): Protokoll: Whole Mount In Situ Hybridization. E-mail: <u>guenther@gsf.de</u>.

Schulz E.; Gibson M.C. and Champion T. (1978): Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: An EM and radiography study. J. Exp. Zool. 206, 451-456.

Schulz E. and McCormick K.M. (1994): Skeletal muscle satellite cells. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 123, 213-257

Schwenk F.; Baron U.; Rajewsky K. (1995): A Cre Transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. Nucleic Acids Res. 23, 5080-5081.

Seale P. and Rudnicki M.A. (2000): Review: A new look at the origin, function and "stem-cell" status of muscle satellite cells. Dev. Biol. 218, 115-124.

Seale P.; Sabourin L.A.; Girgis-Gabardo A.; Mansouri A.; Gruss P. and Rudnicki M.A. (2000): Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. Cell, Vol. 102, 777-786.

Sicinski P.; Geng Y.; Ryder-Cook A.S.; Barnard E.A.; Darlison M.G. and Barnard P.J. (1989): The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. Science 244, 1578-1580.

Silver, D. P. & Livingston, D. M. (2001) Mol. Cell, in press.

Smith T.H.; Kachinsky A.M. and Miller J.B. (1994): Somite subdomains, muscle cell origins, and the four muscle regulatory factor proteins. J. Cell Biol. 127, 95-105.

Smythe G.M.; Grounds M.D. (2001): Absence of MyoD increases donor myoblast migration into host muscle. Experimental Cell Research 267, 267-274.

Snow M.H. (1990): Satellite cell response in rat soleus muscle undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergists. Anat. Rec. 227, 437-446.

Soriano P (1997): The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and normal patterning of the somites. Development 124, 2691-2700.

Sorrentino V.;Pepperkok R.; Davis R.; Ansorge W. and Philipson L. (1990): Cell proliferation inhibited by MyoD1 independently of myogenic differentiation. Nature 345: 813–815.

Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

Stedman H.H., Sweeney H.L., Shrager J.B., Maguire H.C., Panettieri R.A., Petrof B., Narusawa M., Leferovich J.M., Sladky J.T., Kelly A.M. (1991): The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. Nature 352, 536-539.

Sternberg N. and Hamilton, D. (1981): Bacteriophage P1 sitespecific recombination. I. Recombination between *loxP* sites. J. Mol. Biol. 150, 467-486.

Summerbell D.; AshbyP.R.; Coutelle O.;Cox D.; Yee S.-P. and Rigby P.W.J. (2000): The expression of Myf5in the developing mouse embryo is controlled by discrete and dispersed enhancers specific for particular populations of skeletal muscle precursors. Development 127, 3745-3757.

Tajbakhsh S., Buckingham M.E. (1993): Expression of myogenic factors in the mouse: myf-5, the first member of the MyoD gene family to be transcribed during skeletal myogenesis. C R Acad Sci III; 316 (9): 1032-1046.

Tajbakhsh S., Buckingham M.E. (1994): Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, 747-751.

Tajbakhsh S. and Buckingham M. (1995): Lineage restriction of the myogenic conversion factor myf-5 in brain. Development 121, 4077-4083.

Tajbakhsh S.; Bober E.; Babinet C; Pournin S.; Arnold H. and Buckingham M.E. (1996a): Gene targeting of the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. Dev. Dyn. 206, 291-300.

Tajbakhsh S., Rocancourt D. and Buckingham M.E. (1996b): Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. Nature 384, 266-270.

Tallquist M.D.; Weismann K.E.; Hellström M. and Soriano P. (2000): Early myotome specification regulates PDGFA expression and axial skeleton development. Development 127, 5059-5070.

Thomas K.R.; Capecchi M.R. (1987): Site directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryoderived stem calls. Cell 51, 503-512.

Thomsen D. R.; Stenberg R. M.; Goins W. F. and Stinski, M. F. (1984): Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 659-663.

Toma C.; Pittenger M.F.; Cahill K.S.; Byrne B.J.; Kessler P.D. (2002): Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation 105 (1): 93-98.

Trask R.V. and Billadello J.J. (1990): Tissue-specific distribution and developmental regulation of M and B creatine kinase mRNAs. Biochim. Biophys. Acta 1049, 182-188.

Thyagaranian B.; Guimaraes M.J.; Groth A.C. and Calos M.P. (2000): Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. Genes 244, 47-54.

Valdez M.R.; Richardson J.A.; Klein W.H. and Olson E.N. (2000): Failure of Myf5 to Support Myogenic Differentiation without Myogenin, MyoD, and MRF4. Dev. Biol. 219, 287-298.

Venuti J.M.; Morris J.H.; Vivian J.L.; Olson E.N. and Klein W.H. (1995): Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. J. Cell Biol. 128, 563-576.

Vivian J.L.; Gan L.; Olson E.N. and Klein W. (1999): A Hypomorphic *Myogenin* Allele Reveals Distinct *Myogenin* Expression levels Required for viability, Skeletal Muscle Development, and Sternum Formation. Dev. Biol. 208, 44-55.

Vivian J.L.; Olson E.N. and Klein W. (2000): Thoracic Skeletal Defects in Myogenin- and MRF4-Deficient Mice Correlate with early Defects in Myotome and Intercostal Musculature. Dev. Biol. 224, 29-41.

Vooijs M.; Jonkers J.; Berns A. (2001): A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that *loxP* recombination is position dependent, EMBO *reports* vol. 2 No. 4, 292-297 (European Molecular Biology Organization).

Wang D.-Z.; Valdez M.R.; McAnally J.; Richardson J. and Olson E.N. (2001): The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. Development 128, 4623-4633.

Wang Y.; Krushel L.A. and Edelman G.M. (1996a): Targeted DNA recombination *in vivo* using an adenovirus carrying the *cre* recombinase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, 3932-3936.

Wang Y.; Schnegelsberg P.N.; Dausman J.; Jaenisch R. (1996b): Functional redundancy of the muscle-specific transcription factors Myf5 and myogenin. Nature 379, 823-825.

Wang Y; Jaenisch R. (1997): Myogenin can substitute for Myf5 in promoting myogenesis but less efficiently. Development 124, 2507-2513.

Warren G.L.; Hayes D.A.; Lowe D.A.; Williams J.H. and Armstrong, R.B. (1994): Eccentric contraction-induced injury in normal and hindlimb-suspended mouse soleus and EDL muscles. J. Appl. Physiol. 77, 1421-1430.

Warren G.L.; Lowe D.A.; Inman C.L.; Orr O.M.; Hogan H.A.; Bloomfield S.A. and Armstrong, R.B. (1996): Estradiol effect on anterior crural muscles-tibial bone relationship and susceptibility to injury. J. Appl. Physiol. 80, 1660-1665.

Weintraub H.; Davis R.; Tapscott S.; Thayer M.; Krause M.; Benezra R.; Blackwell T.K.; Turner D.; Rupp R. Hollenberg S. and et al. (1991): The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. Science 251, 761-766.

Wigston D.J. and Sanes J-R. (1982): Selective reinnervation in adult mamalian muscle by axons from different segmental levels. Nature 299, 464-467.

Williams, L. W. (1910). The somites of the chick. Am. J. Anat. 2, 22-100.

Williams B.A.; Ordahl C.P. (2000): Fate restriction in limb muscle precursor cells precedes highlevel expression of MyoD family member genes. Development 127, 2527-2536.

Winchester P.K.; Davis M.E.; Always S.E. and Gonyea, W.J. (1991): Satellite cell activation in the stretch-enlarged anterior latissimus dorsi muscle of the adult quail. Am J. Physiol. 260 (Cell Physiol. 29), C206-C212.

Wright W.E.; Sassoon D.A. and Lin V.K. (1989): Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. Cell 56, 607-617.

Yablonka-Reuveni Z.; Rudnicki M.A.; Rivera A.J.; Primig M; Anderson J.E.; Natanson P.(1999): The transition from Proliferation to Differentiation is Delayed in Satellite Cells from Mice Lacking MyoD. Developmental Biology 210, 440-455.

Yoon J.K.; Olson N.E.; Arnold H.H. and Wold B.J. (1997): Different *MRF4* Knockout Alleles Differentially Disrupt Myf-5 Expression: *cis*-Regulatory Interactions at the *MRF4/Myf-5* Locus. Dev. Biol. 188, 349-362.

Zammit P.S.and Beauchamp J. R. (2001): The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? Differentiation 68, 193-204.

Zhang W.; Behringer R.R.; Olson E.N. (1995): Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in upregulation of myogenin and rib anomalities. Genes & Development 9, 1388-1399.

Zhang M. and McLennan I.S. (1998): Primary Myotube preferentially mature into either the fastest or slowest muscle fibres. Developmental Dynamics 213 (1), 149-159.

Zhang and Gridley (1999): Abgedruckte Erklärung zur Publikation von Moran *et al.* 1999a. Nature 399, 743.

Zijlstra M.; Bix M.E.; Simister J.M.; Loring D.H.; Raulet R. Jaenisch R. (1990): Beta 2 microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. Nature Vol. 344, 742-746.

Zweigerdt R.; Braun T.; Arnold H.H. (1997): Faithful expression of the Myf-5 gene during mouse myogenesis requires distant control regions: a transgene approach using yeast artificial chromosomes. Dev Biol. 192 (1), 172-180.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, Axel Kaul, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekenzeichnet.

Diese Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule oder Universität zur Promotion eingereicht.

Dresden, den 12.März 2003

Axel Kaul