

**Die Rolle skelettmuskelspezifischer
Transkriptionsfaktoren und deren
Co-Regulatoren während der Myogenese und
Regeneration**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
RERUM NATURALIS



VORGELEGT DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT I
BIOWISSENSCHAFTEN
DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

von

Herrn Stefan Günther
geb. am: 14.03.1978 in: Riesa

Gutachter/in:

Halle/Saale, den

Meinen Eltern
Eva-Maria und Christian Günther

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen Mittel, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt, beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Bad Nauheim, den 1. Februar 2010

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
1. ZUSAMMENFASSUNG	4
2. EINLEITUNG	5
2.1. Die embryonale Entwicklung der Skelettmuskulatur in Vertebraten	5
2.1.1. Somitogenese und frühe Myogenese.....	5
2.1.2. Die Regulation der frühen Myogenese.....	6
2.1.3. Bildung der embryonalen Extremitäten	8
2.1.4. Die <i>myogenic regulatory factors</i> (MRFs).....	9
2.2. Satellitenzellen und Regeneration der Muskulatur	11
2.2.1. Die Bedeutung von <i>Pax7</i> während der Embryogenese und Muskelregeneration	12
2.3. Transkriptionelle Steuerung wichtiger Entwicklungsprozesse	14
2.3.1. Die TEF Proteine, eine Familie von MCAT bindenden Faktoren	14
2.3.2. Transkriptionelle Steuerung durch MCAT Motive.....	16
2.3.3. Zur Transaktivierung durch TEF-1 werden Koaktivatoren benötigt.....	17
2.3.4. Die VITO Gene sind eine neue Gruppe <i>vestigial</i> verwandter Proteine	18
2.4. Ziele der Arbeit	23
3. MATERIAL	24
3.1. Chemikalien	24
3.2. Enzyme.....	25
3.3. Standardlösungen und Stammlösungen.....	25
3.4. Verbrauchsmaterial	25
3.5. Verwendete "Kits"	25
3.6. Verwendete Bakterienstämme	26
3.7. Verwendete Zelllinien	26
3.8. Southern Proben für Genotypisierung	26
3.9. Verwendete Oligonukleotide.....	27
3.9.1. Oligonukleotide für Genotypisierungen und Sonden	27
3.9.2. Oligonukleotide für Klonierungen	27
3.9.3. Oligonukleotide für EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).....	28
3.9.4. Oligonukleotide für Sequenzierung und Klonierungskontrolle	28
3.10. Verwendete Mauslinien	29
3.11. Verwendete Vektoren	29
3.12. Verwendete Antikörper	30
3.12.1. Erst-Antikörper	30
3.12.2. Zweit-Antikörper	30
4. METHODEN	31
4.1. Sterilisation von Lösungen und Geräten.....	32
4.2. Konstruktion eines konditionalen "Targeting"-Vektors.....	32
4.3. Kultur, Transformation und Selektion von ES-Zellen der Maus.....	33
4.4. Herstellung und Haltung transgener Mäuse	34
4.5. Genotypisierung der mutanten Mauslinien	34
4.6. Proteinexpression in Retikulozyten Lysaten	34
4.7. Co-Immunopräzipitation	35
4.7.1. Darstellung des Myc1-9E10.2 Antikörpers.....	36
4.7.2. Immunopräzipitation.....	36
4.7.3. Immunopräzipitation mit überexprimierten Proteinen aus Zell-Lysaten	37
4.7.4. Western Blot.....	37
4.8. Gel-Retentionsanalyse (EMSA).....	38
4.8.1. Radioaktive Markierung eines doppelsträngigen Oligonukleotids.....	38
4.8.2. Gel-Retentionsanalyse	39
4.9. Sequenzierungsreaktion mit ABI PRISM™-System 310	40

4.10. Zellkulturmethoden	40
4.10.1. Kultivierung der Zelllinien	40
4.10.2. Transfektion (Morgan und Darling 1994)	41
4.10.3. Cotransfektion	41
4.10.4. Abernten und Lyse der Zellen	42
4.10.5. Messung und Nachweis der Enzymaktivität.....	42
4.10.5.1. β -Galaktosidase Reaktion.....	43
4.10.5.2. Messung der Luciferase-Aktivität.....	43
4.10.6. Wirkstoff-Screening mit Hilfe einer LOPAC Bibliothek	44
4.10.6.1. Messung des Differenzierungsgrades	44
5. ERGEBNISSE.....	46
5.1. Gezielte Veränderung des <i>Pax7</i> Genlocus	46
5.1.1. Die Konstruktion des „Gene-Targeting“ Vektor	46
5.1.2. Homologe Rekombination des „Targeting-Vektors“ in ES-Zellen.....	48
5.1.3. Die Etablierung von stabilen Mauslinien mit verändertem <i>Pax7</i> Allel	50
5.1.3.1. Die <i>Pax7cKO^{Neo}</i> Mauslinie enthält die geflochten Exone I bis III und die FRT-flankierte Neomycin-Kassette.....	50
5.1.3.2. Die Etablierung der <i>Pax7cKO</i> Linie durch Deletion der Neomycin-Kassette mit Hilfe der Flp-Rekombinase.....	51
5.1.3.3. Funktionelle Ausschaltung von <i>Pax7</i> durch Cre-vermittelte Rekombination in der <i>Pax7KO</i> Mauslinie	52
5.2. Analyse des Phänotyps konditionell deletierter <i>Pax7</i> -Mäuse.....	54
5.2.1. Die Insertion der NeoFRT-Kassette in das 3. Intron resultiert in einem „hypomorphen“ <i>Pax7</i> Allel, dass dem Phänotyp der <i>Pax7^{LacZ}</i> Mäuse entspricht	56
5.2.2. Die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion des <i>Pax7^{loxP}</i> Genlocus führt zu einem vollständigen Erliegen der <i>Pax7</i> Transkription und zu einem Verlust der Satellitenzellen.....	59
5.2.3. Die <i>Pax7cKO</i> Mauslinie zeigt keine Veränderung in der Satellitenzellpopulation und eine Wildtyp-spezifische <i>Pax7</i> Expression	64
5.3. Charakterisierung der VITO-Genfamilie	66
5.3.1. Sequenzanalyse und -vergleiche von <i>mVITO-1</i> und <i>mVITO-2</i>	66
5.4. Nachweis der Interaktion von <i>mVITO-1</i> und <i>mVITO-2</i> mit Transkriptions-faktoren der TEF-Familie	69
5.4.1. Herstellung der VITO Expressionskonstrukte	69
5.4.2. Zur Interaktion von <i>mVITO-1</i> mit TEF-1 <i>in vitro</i> wird die SID benötigt	70
5.4.3. Die Bindung von TEF-1 mit <i>mVITO-2</i> erfolgt durch die SID.....	73
5.4.4. Nachweis der TEF-1 Interaktion mittels überexprimierter Proteine aus HEK293 Zellen.....	75
5.5. Die Interaktion der TEFs mit den VITO Proteinen führt zur Transaktivierung MCAT-abhängiger Reporter <i>in vivo</i>	78
5.5.1. Zur Transaktivierung MCAT-abhängiger Reporter durch TEF-1 wird <i>mVITO-1</i> benötigt.....	80
5.5.2. Die Interaktion von <i>mVITO-2</i> mit TEF-1 und TEF-3 führt zur Aktivierung MCAT-abhängiger Reporter	81
5.6. Die VITO Proteine ändern die DNA Bindeeigenschaften der TEFs <i>in vitro</i>	84
5.6.1. Die <i>in vitro</i> Interaktion von <i>mVITO-1</i> mit den TEF-1 verringert die Bindung an isolierte MCAT Motive	84
5.6.2. Die MCAT-Bindung von TEF-3 wird von <i>mVITO-1</i> nur gering beeinflusst	87
5.6.3. Die DNA Bindeeigenschaften von TEF-1 werden auch durch <i>mVITO-2</i> negativ beeinflusst.....	88
5.6.4. Die Veränderungen der DNA-Bindeeigenschaften der TEFs werden durch die Anzahl der MCAT Motive beeinflusst	90
5.7. Gezielte Veränderung des <i>mVITO-2</i> Genlocus	92
5.7.1. Isolierung von Cosmid-Klonen mit genomischen Fragmenten des <i>mVITO-2</i> Gens.....	92
5.7.2. Konstruktion des „Targeting“ Vektors zur Generierung eines konditionellen <i>mVITO-2</i> Gens.....	92
5.7.3. Homologe Rekombination des „Targeting-Vektors“ in ES-Zellen.....	94
5.7.4. Etablierung der <i>mVITO-2cKO</i> Mauslinie mit homozygoten <i>mVITO-2^{loxP}</i> Allel.....	96
5.7.5. Die funktionelle Ausschaltung des <i>mVITO-2 Gens</i> durch Cre-vermittelte Rekombination.....	98

5.8. Suche nach muskeldifferenzierungs-fördernden Substanzen in einer pharmakologischen Stoffbibliothek	100
5.8.1. Screening der LOPAC ¹²⁸⁰ Bibliothek durch Messung der MCK-Enzymaktivität.....	100
5.8.2. Überprüfung von Kandidaten der LOPAC ¹²⁸⁰ Bibliothek mit potentiellm Einfluss auf die Differenzierung von Myoblasten	103
5.8.2.1. Nachweis der terminalen Differenzierung durch immunhistochemische Anfärbung mit dem MF20 Antikörper.....	110
6. DISKUSSION	115
6.1. Der konditionelle <i>Knock Out</i> von Pax7 erlaubt eine gezielte Untersuchung des letalen postnatalen Phänotyps der Pax7 ^{-LacZ} Nullmutation und eine genaue Analyse der Bedeutung von Pax7 während der Muskelentwicklung und Regeneration	115
6.1.1. Die Cre-Vermittelte Rekombination im Pax7cKO Locus ermöglicht die funktionelle Ausschaltung der Pax7 Expression	116
6.1.2. Die Aufklärung der Funktion von Pax7 während der neuronalen und embryonalen Entwicklung im Kontext des letalen Phänotyps kann durch die Pax7cKO Linie erfolgen	118
6.1.3. Der konditionelle Pax7 Knock Out erlaubt neue Einblicke in die Rolle der MRFs während der Muskelentwicklung und Regeneration.....	120
6.2. Die Inaktivierung von Pax7 durch das „hypomorphe“ Pax7 ^{-LoxP/Neo} Allel erfolgt durch fehlerhafte Prozessierung der prä-mRNA und führt zu einer leicht veränderten Kopie des Phänotyps der Nullmutation.....	124
6.3. mVITO-1 und mVITO-2 sind Mitglieder einer neuen Genfamilie, welche durch die Scalloped Interaktionsdomäne mit Vertretern der TEF-Familie interagieren können	125
6.4. Die Interaktion zwischen den TEF und VITO Proteinen verändert die DNA-Bindeeigenschaften der Transkriptionsfaktoren und führt zu einer Transaktivierung MCAT-abhängiger Reporter	131
6.5. Die mVITO-2 defiziente Mauslinie zeigt keine Beeinträchtigungen in lebensnotwendigen Körperfunktionen	136
6.6. Verschiedene niedermolekulare Substanzen aus einer LOPAC ¹²⁸⁰ Bibliothek fördern die terminale Differenzierung der Maus Myoblasten-Zelllinie C ₂ C ₁₂	137
7. ANHANG.....	145
7.1. Curriculum vitae.....	145
7.2. Danksagung	146
7.3. Standardlösungen und Stammlösungen.....	147
7.4. Glossar	150
7.5. Veröffentlichungen und Poster	152
8. LITERATUR.....	153

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine in vivo und in vitro Charakterisierung der muskelspezifischen transkriptionellen Co-Regulatoren der VITO-Genfamilie durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die beiden identifizierten cDNAs Mitglieder einer neuen Genfamilie sind, welche durch das Vorhandensein einer Protein-Interaktionsdomäne (SID) gekennzeichnet sind. Die biochemische Untersuchung der beiden Proteine zeigte, dass die SID die VITO Proteine zur Interaktion mit Vertretern der TEF Transkriptionsfaktoren befähigt und zu einer Erhöhung des Transaktivierungspotentials TEF-abhängiger Reporter führt. Aufgrund der muskelspezifischen Expression der beiden Gene während der Embryogenese kann angenommen werden, dass es sich bei den VITO Proteinen um neuartige Co-Regulatoren der muskelspezifischen TEF-abhängigen Transkription handelt. Neben der biochemischen Charakterisierung dieser neuen Faktoren, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Herstellung entsprechender Mausmutanten für die beiden Gene die Voraussetzung für die Analyse der biologischen Funktion der Proteine im lebenden Organismus gelegt. Durch die Insertion eines β -Galaktosidase Reportergens in den VITO-1 Locus kann die native Expression des Gens bei gleichzeitiger Generierung einer Nullmutation beobachtet werden, während das konditionelle Knock Out Allel von VITO-2 ein kombiniertes Ausschalten beider Faktoren - zur Überprüfung eventueller kompensatorischer Effekte - ermöglicht.

Für den myogenen Faktor Pax7 wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Mausmodell generiert. Auch hier ist durch die Generierung eines loxP-abhängigen konditionellen Allels eine räumliche und zeitliche Deaktivierung des Gens möglich. Dadurch sollte die exakte Funktion des Transkriptionsfaktors für die Aufrechterhaltung und Determinierung der Satellitenzellpopulation und die damit verbundene Beeinflussung der Muskelregeneration untersucht werden können. Die zur Kontrolle hergestellte Nullmutation zeigt dabei einen ähnlichen Phänotyp wie das bereits beschriebene konstitutive Knock Out Allel mit einer - im Laufe der postnatalen Entwicklung - stetig abnehmenden Satellitenzellpopulation, während die konditionelle Mauslinie gegenüber der Wildtyp-Situation keine Unterschiede im Phänotyp aufweist. Die Funktionalität des Pax7 Gens, auch nach Insertion von loxP Erkennungsstellen, ist die Voraussetzung für eine zukünftige funktionelle Untersuchung von Pax7. Neben dem konditionellen Allel konnte auch eine Mauslinie mit hypomorphen Phänotyp etabliert werden, welche weitere in vivo Untersuchungen des Transkriptionsfaktors erlaubt.

In einem weiteren, nicht-genetischen Ansatz wurden verschiedene niedermolekulare Substanzen mittels einer neu etablierten in vitro Screening-Methode untersucht, um aktivierende bzw. stimulierende Wirkungen auf die terminale Differenzierung von C₂C₁₂ Myoblasten zu identifizieren. Für die meisten der positiv getesteten Substanzen wurde eine solche Wirkung bislang noch nicht beschrieben. Somit ermöglichen die Aktivatoren einen neuen Ansatz zur Untersuchung der molekularen Abläufe während der Myogenese und bieten möglicherweise neue therapeutische Ansätze zur Behandlung verschiedener Muskelerkrankungen.

2. Einleitung

Ein Ziel der heutigen molekularbiologischen Forschung ist die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die bei der Regulation bestimmter Entwicklungsprozesse während der Embryogenese - wie z.B. die Myogenese oder Neurogenese - beteiligt sind. Ein Schwerpunkt liegt dabei in der Aufklärung der komplexen zellulären Prozesse und molekularen Interaktionen die zu den Schlüsselprozessen wie Determination und Differenzierung führen.

Trotz der Tatsache, dass für viele dieser Entwicklungsprozesse bereits eine Vielzahl von Faktoren, Signalkaskaden und Netzwerken identifiziert worden sind, werden stetig neue Faktoren entdeckt, deren Funktionen noch nicht bekannt sind oder noch nicht in bestehende Schemata eingebunden werden können. Ebenso ist die Regulation bestimmter Schlüsselfaktoren noch weitestgehend unbekannt und die für ihre Spezifität verantwortlichen, sog. Co-Regulatoren wurden zwar postuliert, konnten jedoch in ihrer Existenz und Funktion noch nicht nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wird die Funktion bzw. Auswirkung bestimmter Faktoren in der Entwicklung und Regeneration der Vertebraten-Muskulatur untersucht. Grundsätzlich kann man in Vertebraten drei verschiedene Arten von Muskeln unterscheiden: Quergestreifte Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur und glatte Muskulatur. Diese Muskeltypen unterscheiden sich sowohl in ihrer Morphologie, Funktion und Entwicklung. Da diese Arbeit sich auf die Vorgänge in der Skelettmuskulatur beschränkt, werden der Aufbau und die Funktion einleitend näher beschrieben.

2.1. Die embryonale Entwicklung der Skelettmuskulatur in Vertebraten

2.1.1. Somitogenese und frühe Myogenese

In Vertebraten werden die Skelettmuskelzellen des Körperrumpfes, der Extremitäten und Teilen des Kopfes aus dem paraxialen Mesoderm gebildet, das sich angrenzend zum Neuralrohr und Notochord befindet. Während der Somitogenese werden aus mesenchymalen Zellen des paraxialen Mesoderms rechts und links des Neuralrohres epitheliale Strukturen gebildet, die Somiten (Christ und Ordahl 1995). Die kugelartige Struktur der Somiten löst sich in der weiteren Entwicklung in drei Bereiche auf: das Dermamyotom, das Myotom und das Sklerotom (Abbildung 1A).

Zellen aus dem ventralen Bereich der Somiten delaminieren und bilden das mesenchymale Sklerotom, aus welchen sich später die Wirbel- und Rippenknochen sowie die Bandscheiben entwickeln (Abbildung 1B). Das Dermamyotom, welches sich aus der dorsalen Hälfte des Somiten entwickelt, verbleibt in einem epithelialen Zellverband. Die Zellen des Dermamyotoms bilden den Ursprung der epaxialen und hypaxialen Muskulatur (Ordahl und Le Douarin 1992) und zeichnen sich durch einen weiterhin proliferativen und undifferenzierten Zustand aus.

Der mediale Teil des Dermamyotoms, welches später Bestandteile der Dermis bildet, wird als Dermatome bezeichnet und verbleibt als mesenchymaler Zellverband. Die Zellen am dorso-medialen Rand des Dermamyotoms deepithelialisieren und formen durch Delamination das - medial zwischen

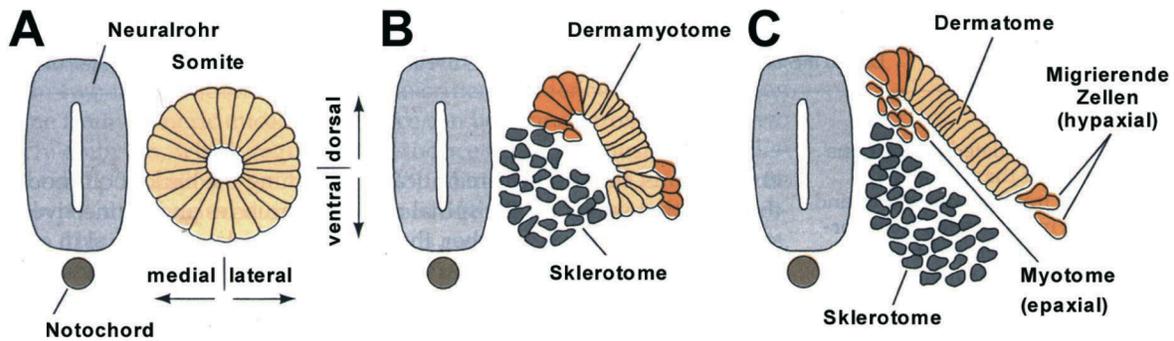


Abbildung 1: Die schematische transversale Darstellung differenzierender Somiten. Während der Myogenese entwickelt sich aus den undifferenzierten, kugelförmigen und epithelialen Somiten (A), durch Delamination die ventro-medialen Zellen des Sklerotoms (B). Durch weitere epitheliale-mesenchymale Transformationen entstehen aus der dorso-medialen Lippe des verbleibenden Dermamyotoms das epaxiale Myotom und aus der ventro-lateralen Lippe die hypaxialen Muskelvorläuferzellen (C). Übernommen aus Gilbert 1997.

dem Dermamyotom und Sklerotom gelegene - Myotom, aus dem später die epaxiale Muskulatur hervorgeht und aus Interkostalmuskulatur und tiefer Rückenmuskulatur besteht (Abbildung 1C). Durch die Expression von Genen der MyoD-Familie (*Myf5*, *MyoD*, *Myogenin* und *Myf6*) (Ott *et al.* 1991; Braun *et al.* 1992) findet hier die erste myogene Differenzierung in der embryonalen Skelettmuskelentwicklung statt und wird als frühe Myogenese bezeichnet (Denetclaw *et al.* 1997; Williams und Ordahl 1997).

Im Bereich der ventro-lateralen Lippe des Dermamyotoms entstehen - nach einer epithelial-mesenchymalen Transformation - die Zellen der hypaxialen Muskulatur (Abbildung 1C). Diese Zellen bilden später die Muskeln der Extremitäten, der Zunge und der Körperwand. Die Migration dieser hypaxialen Muskelvorläuferzellen in ihre Zielbereiche ist durch eine Expression der Transkriptionsfaktoren *Pax3* (Bober *et al.* 1994; Goulding *et al.* 1994), *Lbx1* (Mennerich *et al.* 1998; Schäfer und Braun 1999) und *c-met* (Bladt *et al.* 1995) gekennzeichnet. Nach Beendigung der Migration wird mit der Expression der MyoD-Familie die myogene Differenzierung der hypaxialen Muskulatur eingeleitet (Sassoon *et al.* 1989; Braun *et al.* 1994; Tajbakhsh und Buckingham 1994).

2.1.2. Die Regulation der frühen Myogenese

Zu Beginn der Myogenese spielen Signale aus dem Neuralrohr und dem Notochord eine entscheidende Rolle für die Ausbildung der Somiten. Die entscheidenden Prozesse konnten bereits von verschiedenen Gruppen hauptsächlich mit Ablations- und Transplantationsversuchen an Hühnchen-Embryonen aufgeklärt werden (Buffinger und Stockdale 1994; Stern und Hauschka 1995; Stern *et al.* 1995; Spence *et al.* 1996). Es zeigte sich dabei, dass das Hauptpotential der Aktivierung im dorsalen Neuralrohr zu finden ist, während vom ventralen Neuralrohr und vom Notochord nur eine schwache myogene Aktivität ausgeht. Experimente, in denen das Neuralrohr und/oder das Notochord entfernt wurde(n), resultierten jedoch in einem totalen Verlust der myogenen Muskelentwicklung, was zeigt, dass erst die Kombination aller Signale aus dorsalem und ventralem Neuralrohr sowie Notochord

zu einer vollständigen Induktion der Myogenese führt (Christ *et al.* 1992). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass diese Signale nur im pre-somitischen Mesoderm und in jungen Somiten zur Stimulation der Muskelentwicklung nötig sind, während sich reife Somiten unabhängig von diesen Geweben entwickeln. Des Weiteren sind in jungen Somiten nur die epaxialen Bereiche abhängig von den axialen Signalen. Die hypaxialen Muskelvorläufer zeigen hingegen eine Abhängigkeit von Signalen aus dem dorsalen Ektoderm (Rong *et al.* 1992).

Wichtige Induktoren der Somitogenese sind *Sonic Hedgehog (Shh)*, *Noggin* sowie Mitglieder der TGF β Familie (BMPs) und der Wnt-Familie. Daneben spielen auch die *fibroblast growth factors (FGFs)*, als Regulatoren der Proliferation und Differenzierung der Muskelvorläuferzellen eine wichtige Rolle (Itoh *et al.* 1996; Flanagan-Steet *et al.* 2000). *Shh* ist sowohl im ventralen Neuralrohr (neurale Grundplatte) als auch im Notochord exprimiert, während die Sekretion der restlichen Signalmoleküle im dorsalen Neuralrohr bzw. im lateralen Mesoderm erfolgt. Explantierungsversuche im Hühnchen-Embryonen zeigten tatsächlich, dass die Induktion der Myogenese mittels axialer Strukturen durch die kombinatorische Aktivität von *Shh* und Vertretern der Wnt-Familie ersetzt werden kann (Münsterberg und Lassar 1995; Stern *et al.* 1995).

Die Sekretion von *Shh* und *BMP4* führt ferner zur Ausbildung des Sklerotoms, das sich durch die Präsenz des Transkriptionsfaktors *Pax1* auszeichnet, welcher Knorpel-spezifische Gene aktiviert, die wiederum für die spätere Bildung der Wirbel verantwortlich sind. Dagegen sind die dermamyotomalen Marker *Pax3* und *Pax7* im Sklerotom durch beide Faktoren inhibiert (Fan und Tessier-Lavigne 1994). Wie bereits erwähnt, führt eine Ablation des Neuralrohrs und des Notochords zur Abwesenheit der epaxialen Muskulatur, weshalb *Shh* hauptsächlich für die Determination der epaxialen Myoblasten und weniger für die Ausbildung der hypaxialen Vorläufer verantwortlich gemacht wird (Borycki *et al.* 1999). Weiterführende Experimente zeigten jedoch, dass *Shh* auch für die Expression der *myogenic regulatory factors (MRFs)* in den hypaxialen Muskeln und die Ausbildung der Myotuben der Extremitätenmuskulatur verantwortlich ist (Duprez *et al.* 1998). Die Untersuchungen an Maus-*Shh*-Null-Mutanten zeigten eine starke Beeinträchtigung bei der Bildung der hypaxialen Muskulatur in den Extremitäten, wobei die ersten Schritte der hypaxialen Muskelentwicklung jedoch kaum beeinflusst, sondern höchstens temporär verzögert waren (Krüger *et al.* 2001). Daher ist anzunehmen, dass *Shh* nicht der Hauptregulator der Myogenese, sondern ein Proliferationsfaktor für die epaxialen sowie hypaxialen Bereiche des Dermamyotoms ist.

Die Aufgabe der Wnt Signalmoleküle in der Skelettmuskelentwicklung besteht in der dorso-ventralen Unterteilung der Somiten und der Determination zwischen sklerotomer und dermamyotomaler Entwicklung der Somitenzellen (Münsterberg und Lassar 1995; Marcelle *et al.* 1997). Dabei scheint *Wnt1*, und vermutlich auch andere Vertreter der Wnt-Familie (*Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt6*), ausgehend vom dorsalen Neuralrohr und zusammen mit *Shh* die Myogenese über einen *Myf5*-abhängigen Signalweg zu stimulieren. Dagegen bewirkt *Wnt7a*, ausgehend vom lateralen dermalen Ektoderm, eine Aktivierung der Muskelentwicklung über eine *MyoD*-abhängige Kaskade.

Neben der Funktion von *BMP4* bei der Ausbildung des Sklerotoms, liegt die Hauptaufgabe der BMPs während der Myogenese in der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustands der migrierenden Myoblasten, bis diese ihre Zielgebiete erreicht haben (Pourquie *et al.* 1996; Amthor *et al.* 1999).

Neben den genannten Faktoren ist die Funktion bzw. die Existenz einer Vielzahl von Genen - die ebenfalls in den Prozess der Determination, Proliferation, Migration und Differenzierung von Vorläuferzellen in den Somiten eingebunden sind - noch nicht nachgewiesen. Für ein vollständiges Verständnis der Abläufe während der Muskelentwicklung ist die Suche bzw. die funktionelle Analyse dieser Faktoren jedoch notwendig.

2.1.3. Bildung der embryonalen Extremitäten

Auf der Höhe der Extremitäten delaminieren *MyoD*-negative Zellen aus dem Epithelium des hypaxialen Dermamyotoms und migrieren in die Extremitätsknospen, wo sie zunächst weiter proliferieren und schließlich zu Skelettmuskeln differenzieren. In diesen Prozess sind eine Vielzahl von Faktoren eingebunden, wie z.B. *Pax3*, *c-met*, *Tbx1*, *Mox2*, *Six1*, *Six2*, *Pitx2* und *Lbx1* (Buckingham *et al.* 2003).

Der Prozess der Delamination sowie der Migration ist von der Expression des Tyrosin-Kinase-Rezeptors *c-met* und seinem Liganden *HGF* (auch *scatter factor* genannt) abhängig. *HGF* wird entlang des Migrationsweges von nicht-somitischen mesodermalen Zellen sekretiert (Dietrich *et al.* 1999). Sowohl *c-met* wie *HGF* *Knock out* Mutanten in der Maus zeigen einen totalen Verlust der Skelettmuskeln in den Extremitäten (Bladt *et al.* 1995; Schmidt *et al.* 1995). Die Transkription von *c-met* ist wiederum abhängig vom Transkriptionsfaktor *Pax3*, der bereits sehr früh im Embryo - schon während der Formung des paraxialen Mesoderms und später im dorsalen Neuralrohr sowie Dermamyotom - exprimiert wird. *Pax3* Maus-Mutanten (auch *spotch*-Mäuse genannt) zeigen wie *c-met*- und *HGF*-Mutanten einen Verlust der Extremitätenmuskulatur, da keine Zellen vom hypaxialen Dermamyotom delaminieren (Tajbakhsh *et al.* 1997), obwohl ihr Differenzierungspotential nicht eingeschränkt ist (Daston *et al.* 1996; Bober *et al.* 1994). Darüber hinaus zeigte sich in *Pax3/Myf5* Doppelmutanten eine fehlende Expression von *MyoD* und ein damit verbundenes Fehlen der Körpermuskeln. Daraus lässt sich schließen, dass beide Faktoren zeitlich vor *MyoD* agieren und *Pax3* ein entscheidender Regulator der *MyoD*-abhängigen Entwicklung der Körpermuskulatur ist.

Der Transkriptionsfaktor *Lbx1* ist ebenfalls an der Migration der Muskelvorläuferzellen aus den Somiten beteiligt. Die Rolle in der Myogenese wurde ebenfalls über *Lbx1*-Mausmutanten nachgewiesen. Diese zeigen zwar noch eine Delamination der Myoblasten vom Dermamyotom, jedoch verbleiben diese in der Umgebung der Somiten und migrieren nicht in ihre Zielorte (Schäfer und Braun 1999). Die Expression von *Lbx1* scheint hauptsächlich von *Pax3* abhängig zu sein, da in den *spotch*-Mäusen die *Lbx1*-Expression vollständig aufgehoben ist. Es müssen jedoch noch ein oder mehrere weitere Faktoren an der Regulation von *Lbx1* beteiligt sein, da in den Bereichen zwischen den Extremitäten von Hühnchen-Embryonen, trotz *Pax3* Expression, kein *Lbx1* exprimiert wird. Auch weitere beobachtete Eigenschaften von *Lbx1* sind noch weitestgehend ungeklärt; So ruft das Fehlen von *Lbx1* interessanterweise unterschiedliche Effekte in den vorderen und hinteren Extremitäten hervor und es

bleibt außerdem ungeklärt in welchem Zusammenhang der zellautonome Effekt von *Lbx1* mit der Kontrolle der Migration durch das *c-met/HGF* System steht.

Ein weiterer Faktor, der in den Muskelvorläuferzellen exprimiert wird, ist *Mox2* (*mesenchyme homeobox 2*). In *Knock Out* Mutanten von *Mox2* ist die Expression von *Myf5* und *Pax3*, jedoch nicht von *MyoD* reduziert. Dies lässt darauf schließen, dass dieser Transkriptionsfaktor die *Myf5*-abhängige Differenzierung kontrolliert (Mankoo *et al.* 1999), während die *MyoD* Expression in den Extremitäten vermutlich von den Six-Homeo-Proteinen *Six1* und *Six4*, zusammen mit ihren Cofaktoren *Eya* und *Dach*, kontrolliert wird (Relaix und Buckingham 1999).

2.1.4. Die myogenic regulatory factors (MRFs)

Während die bisher genannten Faktoren hauptsächlich für die Aufrechterhaltung der Migration der Vorläuferzellen von den Somiten in die späteren Muskelanlagen verantwortlich sind, erfolgt nach dem Erreichen eine Aktivierung der myogenen Determinierung durch Expression der basischen *helix-loop-helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren *Myf5* und *MyoD* (Tajbakhsh and Buckingham 1994). Beim Fehlen dieser beiden Faktoren bleiben die Zellen zunächst multipotent und nehmen auch nicht-muskelspezifische Identitäten an (Kablar *et al.* 1999). Aufgrund dieser Eigenschaften werden *Myf5* und *MyoD* auch als *myogenic regulatory factors* (MRFs) bezeichnet, zu denen auch *Myogenin* und *Myf6* gehören. Alle Mitglieder dieser Familie bilden mit anderen ubiquitär exprimierten bHLHs (E12, E47) Heterodimere und aktivieren so ihre Zielgene (Lassar *et al.* 1991). Eine weitere wichtige Interaktion der MRFs erfolgt mit den MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*) Faktoren, die zusammen mit *MyoD* den Endpunkt vieler intrazellulärer Signalkaskaden darstellen und somit auch eine Vielzahl muskelspezifischer Gene aktivieren (Molkentin *et al.* 1995; Black und Olson 1998).

Die MRFs zeigen darüberhinaus eine Expression im Myotom während der Embryonalentwicklung der Maus, wobei *Myf5* das erste Transkript ist, welches ab dem Embryonalstadium E8.0 - wahrscheinlich ausgelöst von *Shh* - exprimiert wird (Ott *et al.* 1991). Ab E8.5 folgen die Expression von *Myogenin* und anschließend die transiente Transkription von *Myf6* zwischen E9.0 und E11.5 (Sassoon *et al.* 1989; Bober *et al.* 1991; Hinterberger *et al.* 1991). Als letzter Vertreter der MRFs, wird ab E9.75 bis zum Ende der Embryonalentwicklung *MyoD* exprimiert.

Entscheidende Erkenntnisse über die Rolle der MRFs in der Regulation der Myogenese haben verschiedene Maus-*Knock out* Mutanten geliefert. Weder die Nullmutation von *Myf5* noch von *MyoD* zeigten größere Veränderung der Muskeln in adulten Tieren. Ein Fehlen von Myoblasten ist nur in homozygoten *Myf5* Mutanten während der frühen Somiten-Entwicklung zu beobachten. Mit dem Einsetzen der *MyoD* Expression ab E10.5 wird dies jedoch kompensiert, so dass zur Geburt kein nennenswertes Defizit an Muskeln existiert (Braun *et al.* 1992; Rudnicki *et al.* 1992). Homozygote *MyoD* Mutanten zeigen dagegen auch während der Embryogenese keine auffälligen Veränderungen. Jedoch besitzen diese Mäuse, nach Einkreuzung in den Dystrophin defizienten Mausstamm *mdx* und akuter Verletzung der Muskeln, eine verschlechterte Regenerationsfähigkeit (Megeney *et al.* 1996).

Dies legt nahe, dass *MyoD* auch bei der Aktivierung und Differenzierung der Satellitenzellen, welche für die Regeneration der Muskeln verantwortlich sind, beteiligt ist.

Erst das Ausschalten beider Gene führte zu einem Totalverlust muskel-spezifischer mRNAs und damit auch zum Fehlen von Vorläuferzellen. Aufgrund dieses Phänotyps sterben die Doppelmutanten sofort nach der Geburt und zeigen in den Bereichen, in denen normalerweise die Skelettmuskeln vorhanden sind, amorphes Binde- und Fettgewebe (Rudnicki *et al.* 1993). Diese Erkenntnisse sowie Ergebnisse weiterer Versuche legen nahe, dass die Expression von *MyoD* und *Myf5* zwei verschiedene Muskel-Zelllinien kennzeichnet, die sich aus unabhängigen Stammzellen rekrutieren (Braun und Arnold 1996). Aufgrund redundanter zellulärer Funktionen können die *Myf5*-abhängigen medialen und *MyoD*-abhängigen lateralen Myoblasten sich gegenseitig ersetzen und einen Verlust kompensieren.

Während *Myf5* und *MyoD* in proliferierenden Muskelvorläuferzellen aktiv sind, erfolgt die Expression von *Myogenin* und *Myf6* erst bei der terminalen Differenzierung der Myoblasten und in den Myotuben (Megenev und Rudnicki 1995). *Knock out* Mutanten für *Myogenin* zeigen in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung noch keine Veränderungen der Myogenese, aber ab Embryonalstadium E13.0 kommt die weitere Entwicklung der Muskeln zum Erliegen (Hasty *et al.* 1993; Nabeshima *et al.* 1993). Dies lässt darauf schließen, dass *Myogenin* eine entscheidende Rolle bei der terminalen Differenzierung der Myoblasten spielt und dies nicht - wie bei *Myf5/MyoD* - von anderen Faktoren kompensiert werden kann. Für *Myf6* existieren verschiedene Mausmodelle, die sich sowohl in ihrer *Knock Out* Strategie als auch in ihren Phänotypen unterscheiden (Braun und Arnold 1995; Patapoutian *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1995). Allen drei Modellen ist jedoch gemeinsam, dass sie trotz einer erhöhten *Myogenin* Expression und einer Veränderung in der Bildung verschiedener Protein-Isoformen des kontraktile Apparats, eine kaum abweichende Entwicklung der Skelettmuskeln zeigen.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass zu Beginn der Myogenese eine Rekrutierung der Muskelvorläuferzellen aus den epithelialen Somiten erfolgt. Diese findet über zwei unabhängige Wege statt; zum einen über *Myf5*, bedingt durch Signale aus dem Neuralrohr und dem Notochord, und zum Zweiten über die *MyoD*-abhängige Signalkaskade, ausgehend von Faktoren aus dermalen Ektoderm. Dabei kann jeder Signalweg durch den anderen kompensiert werden und die Muskelentwicklung erfolgt, bis auf eine zeitliche Verzögerung, normal. Die Initialisierung der Myogenese wird also über diese beiden Transkriptionsfaktoren geregelt, während die Migration und terminale Differenzierung von einer Vielzahl weiterer Faktoren abhängig sind. Dabei zeigt sich, wie am Beispiel von *Myogenin*, dass viele Signalmoleküle zwar eine entscheidende, aber nicht exklusive Rolle spielen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass noch weitere Faktoren an der Regulation dieser Vorgänge beteiligt sind.

2.2. Satellitenzellen und Regeneration der Muskulatur

Reife kontraktile Myotuben gehen aus der Fusion von ca. 300 Myoblasten hervor. Da die Myotuben postmitotisch, und somit nicht mehr teilungsfähig sind, können sie sich im Falle einer Verletzung nicht selber ersetzen. In Vertebraten existieren daher Pax3/Pax7-positive Satellitenzellen, die als separate Zellen innerhalb der Basallaminamembran, welche die Muskelfaser umgibt, lokalisiert sind (Seale *et al.* 2000; Relaix *et al.* 2005). Nach Aktivierung durch Dehnung bzw. Beanspruchung beginnen die Satellitenzellen sich zu teilen und bilden einen Pool von Muskelvorläuferzellen, der zur Fusion mit defekten Myotuben oder zur Bildung neuer Myotuben genutzt wird (Appell *et al.* 1988; Winchester *et al.* 1991; Schulz und McCormick 1994). Es wird vermutet, dass durch eine asymmetrische Teilung einer Satellitenzelle eine der Tochterzellen als Muskelstammzelle erhalten bleibt, während die Zweite als Muskelvorläufer weiter proliferieren kann um den Pool an Myoblasten zu erweitern oder in die myogene Differenzierung eintritt (Conboy und Rando 2002; Zammit *et al.* 2004; Shinin *et al.* 2006; Kuang *et al.* 2007).

Wie die embryonale Myogenese ist auch die Regeneration von Skelettmuskeln durch die spezifische Kontrolle der Proliferation von Muskelvorläuferzellen, ihrer myogenen Differenzierung und der anschließenden Fusion der Myoblasten zu multinuklearen Myotuben charakterisiert. Dabei fällt auf, dass einer Vielzahl von Signalmolekülen, die auch während der embryonalen Entwicklung aktiv sind, bei der Regeneration eine wichtige Rolle zukommt. So bedarf es unter anderem der Expression der MRF-Familienmitglieder Myf5, MyoD und Myogenin zum korrekten Ablauf der regenerativen Prozesse (Abbildung 2). Zum Beispiel führt die Abwesenheit von *MyoD* zu einer gewissen Anhäufung von Muskelvorläuferzellen, da ihre Proliferationsphase durch das fehlende Eingreifen von *MyoD* in den Zellzyklus nicht beendet wird. Die Myoblasten bleiben aber *Myf6* negativ und die Muskelregeneration wird nicht effektiv abgeschlossen (Rudnicki *et al.* 1992; Megeney *et al.* 1996; Cornelison *et al.* 2000).

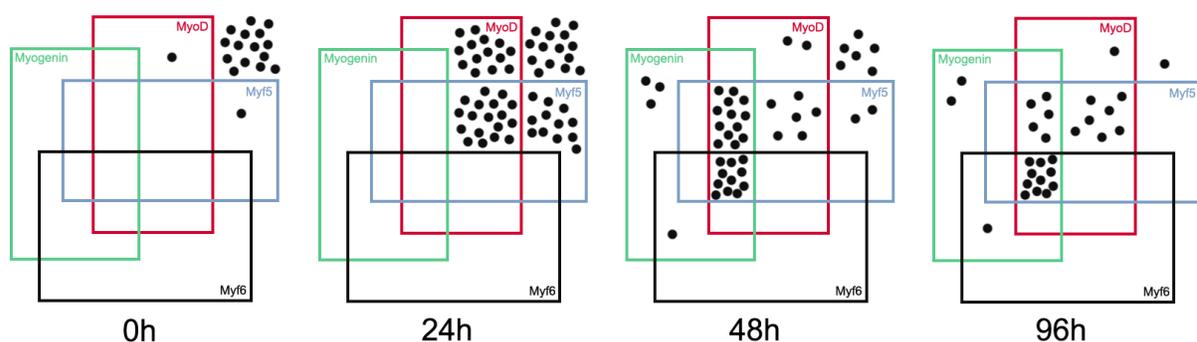


Abbildung 2. Zeitprofil der Expression der 4 MRF-Familienmitglieder in aktivierten Satellitenzellen. Vor der Aktivierung exprimieren nur wenige Zellen Myf5 und MyoD. 24h später sind die Zellen mitotisch aktiv und bilden initial Myf5 und/oder MyoD. Nach weiteren 24h werden zusätzlich die differenzierenden myogenen Faktoren Myogenin und Myf6 exprimiert. 96h nach der Aktivierung überwiegt der Anteil aktivierter Satellitenzellen, die für alle MRFs positiv sind. (Nach Cornelison *et al.* 2000)

Eine Einschränkung der Regenerationsfähigkeit adulter Muskulatur findet sich auch beim Fehlen von Myf5 (Ustanina et al. 2007). Hier scheint der Haupteffekt in einer verminderten Proliferationsfähigkeit von aktivierten Muskelstammzellen zu liegen.

Auch bei der Muskelregeneration wird vermutet, dass noch weitere Signalmoleküle an der Regulation der Prozesse beteiligt sind. Als gesichert gilt, dass die Transkriptionsfaktoren der *MyoD*-Familie in der Induktion der myogenen Differenzierung eine entscheidende Rolle spielen. Die genaue Kontrolle dieser Faktoren sowie die Suche nach weiteren Schlüsselfaktoren sind auch weiterhin Gegenstand der Forschung (Megney et al. 1996; Seale et al. 2004; Buckingham 2006).

2.2.1. Die Bedeutung von *Pax7* während der Embryogenese und Muskelregeneration

Der Transkriptionsfaktor *Pax7* ist eines der neun Mitglieder der Familie der *Paired Box* Gene, welche während der Embryonalentwicklung auf transkriptioneller Ebene die Ausprägung des embryonalen Grundmusters steuern. Alle Mitglieder der Familie zeichnen sich durch das Vorhandensein einer *paired box* DNA-Binde-Domäne aus und zeigen eine sehr hohe Homologie untereinander sowie eine starke evolutionäre Konservierung. Die Expression der einzelnen Pax Gene erfolgt zeitlich und räumlich individuell, wobei diese hauptsächlich während der Embryogenese stattfindet. Ferner werden einige Vertreter der Pax-Familie auch in adulten Stadien exprimiert. So lassen sich beispielsweise Transkripte von *Pax1* im Thymus oder *Pax5* in adulten B-Zellen und in den Hoden nachweisen (Strachan und Read 1994).

Aufgrund des Expressionsmusters besteht die vermutliche Hauptaufgabe von *Pax7* während der Embryogenese vorwiegend in der korrekten Ausbildung der Skelettmuskeln des Rumpfes und der Extremitäten sowie die Entwicklung von Teilen des Zentralnervensystems (Mansouri et al. 1996a; Mansouri et al. 1999; Chi und Epstein 2002). Die Expression von *Pax7* beginnt im Embryonalstadium E8.5 im Bereich der Hirnvesikel sowie in migrierenden Zellen der Neuralleiste und ist ab E11.5 im Mittelhirn im Bereich der hinteren Kommissur - die Verbindungsbahn von Mittelhirnkernen im Bereich des Epithalamus - nachweisbar. Im sich entwickelnden Neuralrohr wird *Pax7* ausschließlich im dorsalen Teil, nach dem Schließen des neuralen Epithels, exprimiert. In den Somiten erfolgt die *Pax7* Expression zuerst im Dermamyotom und ist in der späteren Entwicklung auf die Interkostalmuskulatur beschränkt. Eine weitere Expression findet in der nasalen Grube sowie im nasalen Neuroepithelium statt (Jostes et al. 1990). Umstritten bleibt jedoch weiterhin die Frage, ob und wie weit *Pax7* und/oder *Pax3* direkt während der embryonalen Myogenese benötigt werden (Tajbakhsh et al. 1997; Relaix et al. 2005; Horst et al. 2006).

Neben der Rolle von *Pax7* während der Embryogenese, konnte ebenfalls eine Expression und Funktion im adulten Organismus nachgewiesen werden (Seale et al. 2000). In einer RDA-Analyse (*representational difference analysis*) von cDNAs aus Myoblasten, welche aus Satellitenzellen kultiviert wurden, konnte eine spezifische Expression von *Pax7* gezeigt werden. Weitere Untersuchungen mit Hilfe von *Northern-Blot*- und *In-Situ*-Hybridisierungen konnten diese Beobachtung bestätigen und zeigten zusätzlich eine niedrige Expression von *Pax7* in proliferierenden C₂C₁₂-Myoblasten sowie in

ruhenden Satellitenzellen von adulten Skelettmuskeln. Daher dient Pax7, neben CD34, m-Cadherin, Msx1, cMet, MNFFor Foxk1 (Garry *et al.* 2000) und Snyndecan-4 (Cornelison *et al.* 2001) als molekularer Marker für Satellitenzellen in den Vertebratenmuskeln (Beauchamp *et al.* 2000).

Für drei Mitglieder der Pax-Genfamilie, *Pax1*, *Pax3* und *Pax6*, existieren natürliche Mutationen die als *undulated* (=gewellt), *Spotch* und *Small-eye* Mutanten bezeichnet werden. Auch im Menschen gibt es eine natürliche Mutation von *Pax3*, die als Waardenburg-Syndrom Typ I bezeichnet wird sowie eine Mutation des *Pax6* Gens, welche die familiäre und sporadische Irideremie bzw. Peters-Anomalie verursacht. Für die anderen Vertreter der Pax-Familie wurden künstliche Mutationen erzeugt, um die Funktion der Gene näher zu untersuchen. *Pax7*-Mutanten zeigen in den Bereichen des Mittelhirns, des Rhombencephalons, des Neuralrohrs und im adulten Hirn, in denen normalerweise eine starke Expression zu finden ist, keine auffälligen Veränderungen (Mansouri *et al.* 1996b). Ebenso zeigt sich kein Defekt in der Entwicklung der Skelettmuskulatur, obwohl *Pax7* auch in den Muskelvorläufern exprimiert wird (Jostes *et al.* 1990; Tajbakhsh *et al.* 1997). Die einzigen Auffälligkeiten der neugeborenen Mutanten sind ein verkürzter Kiefer und morphologische Veränderungen der Nase und anderer fascialer Strukturen. Ein möglicher Grund dafür könnte in der überlappenden Expression von *Pax3* und *Pax7* liegen, wodurch das Fehlen von *Pax7* durch *Pax3* kompensiert werden kann. In den Bereichen ohne überlappende Expression resultiert der Verlust von *Pax7* in dem beobachteten Phänotyp (Mansouri und Gruss 1998). Nach der Geburt zeigt das Fehlen von *Pax7* jedoch dramatischere Auswirkungen, denn 97% der neugeborenen Mäuse sterben innerhalb der ersten 3 Wochen. Untersuchungen von Seale und Mitarbeitern zeigten, dass die Mäuse eine reduzierte Muskelmasse sowie einen kompletten Verlust myogener Satellitenzellen aufwiesen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Primärkulturen der *Pax7*^{-/-}-Skelettmuskeln unfähig sind Myoblasten zu bilden und besitzen stattdessen ein erhöhtes Potential zur Bildung hämatopoetischer Zelllinien. Diese Daten ließen darauf schließen, dass *Pax7* eine entscheidende Rolle in der Determinierung und Spezifizierung der Satellitenzellen spielt (Seale *et al.* 2000). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass der frühzeitige Tod der Mäuse vermutlich eher auf die fehlende Expression von *Pax7* in der Neuralleiste zurückzuführen ist, denn das postnatale Wachstum der Muskeln in *Pax7*^{-/-} Mäusen ist nicht gestört und es existiert außerdem eine ausreichende Menge an Satellitenzellen nach der Geburt. Die Anzahl dieser Satellitenzellen nimmt jedoch im Verlauf der weiteren Entwicklung stetig ab, weshalb die spätere Regeneration der Skelettmuskeln beeinträchtigt ist (Kuang *et al.* 2006; Horst *et al.* 2006). Somit besteht die Aufgabe von *Pax7* eher in der Erneuerung und Aufrechterhaltung der Satellitenzelllinie, als in ihrer Determination und Spezifikation (Oustanina *et al.* 2004).

Die Generierung von *Pax Knock Out* Mäusen stellt ein wichtiges Werkzeug zur Analyse der *Pax*-Gene dar. Die funktionelle Redundanz zwischen den verschiedenen Mitgliedern sowie die Existenz alternativer Spliceformen und komplexer Promotoren erschweren jedoch die Untersuchungen. *Knock In*- und konditionelle *Knock Out*-Strategien erlauben es jedoch, bestimmte *Pax*-Gene zu definierten Zeiten in ausgewählten Geweben oder Zelltypen auszuschalten und sind somit einer der nächsten Schritte zur funktionellen Analyse der Pax-Genfamilie.

2.3. Transkriptionelle Steuerung wichtiger Entwicklungsprozesse

Wie bereits beschrieben, werden Entwicklung und Differenzierung der Herz- und Skelettmuskeln durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren gesteuert, die an verschiedene cis-regulatorische Elemente innerhalb der Promotoren der Zielgene binden. Solche Elemente sind z.B. E-Boxen und A/T-reiche Elemente, die mit Vertretern der bHLH-Familie (z.B. *MyoD*) oder den MADS Faktoren (z.B. *MEF-2*) interagieren. Eine der Funktionen der MyoD Familie ist hauptsächlich die Regulation der Skelettmuskelentwicklung (Weintraub 1993; Olson 1993), während die Mitglieder der MEF-2 Familie auch an der Entwicklung der Herzmuskeln beteiligt sind (Chambers *et al.* 1994; Lilly *et al.* 1994; Mar und Ordahl 1990). Die Vertreter der MyoD-Familie zeigen eine muskelspezifische Expression, weshalb sich eine gewebespezifische Regulation durch diese Signalmoleküle leicht erklären lässt (Braun *et al.* 1990; Braun *et al.* 1992; Weintraub 1991). Neben den genannten Erkennungssequenzen sind noch weitere cis-regulatorische Elemente an der Entwicklung der Skelettmuskeln beteiligt, wie z.B. das Serum Response Protein (SRP), das SP-1 Element und die MCAT (*muscle specific* CAT) Bindemotive. An Letztere binden die Transkriptionsfaktoren der TEF-Familie. Im Gegensatz zu den Vertretern der MyoD-Familie ist die Expression der TEFs nicht auf muskelspezifische Bereiche beschränkt, sondern zeigt ein ausgedehntes Expressionsmuster. In solchen Fällen wird vermutet, dass die muskelspezifische Transkription durch eine Ausbildung von Transkriptions-Komplexen mit gewebespezifischen Ko- oder Überbrückungsfaktoren erreicht wird (Carson *et al.* 1996; Mannervik *et al.* 1999).

2.3.1. Die TEF Proteine, eine Familie von MCAT bindenden Faktoren

Die Transkriptions Enhancer Faktoren (TEFs) der Vertebraten gehören zu einer Familie von Proteinen, die sich alle durch die Existenz einer TEA/ATTS Domäne auszeichnen und in Entwicklungsvorgänge der Pflanzen und Tiere eingebunden sind. Bisherige Analysen der TEA-Domäne deuten auf drei α -Helices (Bürglin 1991) oder auf eine α -Helix und zwei β -Faltblätter (Xiau *et al.* 1991) als Grundgerüst hin. Mutagenisierungsstudien der Helices bzw. Faltblätter zeigten, dass sowohl die erste und dritte Helix/Faltblatt für die DNA-Bindung von entscheidender Bedeutung sind, während die Mutagenese der zweiten Helix/Faltblatt keinen Effekt auf die Bindungseigenschaften ausübt (Hwang *et al.* 1993). Der Grad der evolutionären Konservierung der TEA/ATTS Domäne ist sehr hoch und so finden sich auch Proteine mit homologer Domäne in der Hefe (*TEC1*), oder in *Aspergillus nidulans* (*AbaA*) (Andrianopoulos und Timberlake 1991, 1994; Mirabito *et al.* 1989). Das in *Drosophila melanogaster* existierende homologe *scalloped* (*sd*) wird in der Region der Flügelscheibe exprimiert und ist für die korrekte Entwicklung der Flügel verantwortlich. Durch Inaktivierung des *sd* in *Drosophila* konnten verschiedene Mutanten erzeugt werden, die keine funktionsfähigen Flügel mehr ausbilden können (Campbell *et al.* 1992). Neben dieser Funktion lässt sich auch eine Expression von *sd* im zentralen Nervensystem sowie in den peripheren Sinnesorganen nachweisen. Im adulten Hirn ist die Expression

auf Zellareale beschränkt, die für die Ausbildung des Geschmacksinns verantwortlich sind. Auch diese Beobachtungen konnten mit Hilfe von Mutanten verifiziert werden (Inamdar *et al.* 1993). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass die hohe evolutionäre Konservierung der TEA Domäne auf Proteinebene auch eine hohe funktionelle Konservierung bedingt, denn die Expression des humanen NTEF-1 kann das Fehlen von *sd* in *Drosophila* kompensieren (Deshpande *et al.* 1997).

Die meisten Untersuchungen der TEA/ATTS-Familie wurden am TEF-1 durchgeführt. Es wurde zum ersten Mal in HeLa Zellen durch Bindung an die MCAT Motive GT-IIC und Sph(I+II) im SV40 (*Simian Virus 40*) Enhancer identifiziert (Davidson *et al.* 1988; Xiau *et al.* 1987). Im Hühnchen konnten zudem erstmalig die cDNAs von drei verschiedenen Isoformen des TEF-1 identifiziert und kloniert werden (Azakie *et al.* 1996). Diese *TEF-1* Multigenfamilie des Hühnchens wurde deshalb als Referenz zur Einordnung der in anderen Organismen identifizierten cDNAs benutzt (siehe Tabelle 1).

Bis heute wurden insgesamt vier Mitglieder der TEF-1 Familie beschrieben, wobei vermutet wird, dass jedoch möglicherweise noch mehr TEF homologe Gene existieren. Zwei Mitglieder der TEF-1 Familie, NTEF-1 (*n*ominal TEF) und RTEF-1 (*r*elated TEF), sind hauptsächlich im Skelettmuskel exprimiert, während DTEF-1 (*d*ivergent TEF) überwiegend im Herzmuskel gebildet wird (Tabelle 2). ETEF-1 (*e*mbrional TEF) hat ein zeitlich und räumlich abgegrenztes Expressionsmuster im embryonalen Nervengewebe.

Um die Bedeutung von *TEF-1* in der Entwicklung genauer zu analysieren, wurden mit Hilfe von *Genetrap* Vektoren Null-Mutationen für *TEF-1* erzeugt. Die homozygoten Mäuse weisen schwere Fehler bei der Herzmuskelentwicklung auf, weshalb die Embryonen zwischen E10.5 und E11.5 aufgrund von myokardialen Defekten sterben (Melin *et al.* 1993; Chen *et al.* 1994). Da die einzelnen TEFs jedoch nicht ausschließlich in Herz- oder Muskelgewebe exprimiert werden, wird von den Autoren die Existenz von Cofaktoren postuliert, welche die gewebsspezifische Aktivität der Transkriptionsfaktoren - durch Bildung größerer Proteinkomplexe - steuern können (McKenna und O'Malley 2002).

Tabelle 1. Systematische Nomenklatur der Mitglieder der TEF-1 Familie in den Vertebraten. Die Einordnung orientiert sich an publizierten (Xiau *et al.* 1991^a, Blatt und DePamphilis 1993^b, Shimizu *et al.* 1993, Jaquemin *et al.* 1994 und 1996^c, Stewart *et al.* 1994 und 1996^d, Yasunami *et al.* 1996^e, Akazie *et al.* 1996^f, Hsu *et al.* 1996^g, Yockey *et al.* 1996^h), und vermuteten Daten (Larkin und Ordahl 1999).

Organismus	NTEF-1	RTEF-1	DTEF-1	ETEF-1
Hühnchen	cNTEF-1 ^f	cRTEF-1 ^f	cDTEF-1 ^f	—
Mensch	hTEF-1 ^a	hTEF-3 ^{c,d}	hTEF-5 ^c	hTEF-4 ^c
Maus	mTEF-1 ^b	mTEF-3 ^c	mTEF-5 ^c	mTEF-4 ^c
		FR-19 ^g		ETF ^e
		TEFR-1 ^h		

2.3.2. Transkriptionelle Steuerung durch MCAT Motive

Die MCAT Elemente gehören zu einer eigenständigen Klasse von transkriptions-regulatorischen DNA-Sequenzen, die an der Regulation von mindestens zwei Transkriptionsprozessen beteiligt sind. Dies ist zum einen die nicht-zellspezifische Kontrolle der Genexpression des SV40 Virus, bzw. verwandter Viren, in welchen die MCAT-abhängige Transkription an die Kontrollsysteme des Zellwachstums und der Zellteilung gekoppelt ist. Das zweite regulatorische System ist eine gewebe- bzw. zellspezifische Kontrolle, denn die MCAT Motive regulieren die Expression einer großen Anzahl von muskelspezifischen Genen, abhängig von Hormonen, Wachstums- und Hypertrophiesignalen. Eines dieser MCAT kontrollierten Gene ist das *cTNT* (*cardiac Troponin I*), welches in den frühen Stadien der Herz- und Skelettmuskelentwicklung aktiviert ist, in der weiteren Entwicklung jedoch nur noch im Herzgewebe exprimiert wird (Cooper und Ordahl 1984, 1985). Im Promotor des *cTNT* Gens befinden sich zwei konservierte Kopien des MCAT Motivs, die für die Transkription des Gens im embryonalen Skelett- sowie Herzmuskel verantwortlich sind (Mar und Ordahl 1988; Iannello *et al.* 1991). Eine Vielzahl von weiteren Promotoren besitzen ebenfalls MCAT Motive in unterschiedlicher Kopienzahl, die zur Aktivierung der entsprechenden Gene wichtig sind. Dies sind z.B. Promotoren des α -Aktins des Skelettmuskels (MacLellan *et al.* 1994; Karns *et al.* 1995), der schweren Kette des β -Myosins (Thompson *et al.* 1991; Shimizu *et al.* 1992; Flink *et al.* 1992; Kariya *et al.* 1994), der schweren Kette des α -Myosins (Gupta *et al.* 1994; Molkenstin und Markham 1994), des α -Aktins der glatten Gefäßmuskulatur (Cogan *et al.* 1995; Sun *et al.* 1995) sowie der Promotor des β -Acetylcholinrezeptors (Berberich *et al.* 1993). Die MCAT Elemente besitzen innerhalb dieser Promotoren verschiedene Positionen und Funktionen, die von den weiteren Promotoreigenschaften sowie anderen Elementen verstärkt oder kompensiert werden. Durch DNase I „footprinting“ Experimente sowie EMSAs (*Electrophoretic Mobility Shift Assays*) konnte zudem die Bindung einer Reihe von zellulären Faktoren an die MCAT Motive nachgewiesen werden, unter anderem auch die Interaktion mit TEF-1 (Farrance *et al.* 1992, Farrance und Ordahl 1996; Gupta *et al.* 2001).

Tabelle 2. Expression der Mitglieder der TEF-1 Familie in verschiedenen Geweben. (nach Yasunami *et al.* 1995; Azakie *et al.* 1996)

TEF-1 iso-mRNAs und Gewebe							
Name	Herz-musk el	Skelett-mu skel	langsamer Muskel	Gehirn	Lunge	Leber	Niere
RTEF-1	+++	+++	+	-	+	-	-
DTEF-1	+++	+	++	-	++	-	-
NTEF-1	+	++	+	+	+	+	+

2.3.3. Zur Transaktivierung durch TEF-1 werden Koaktivatoren benötigt

Ebenso, wie die Beobachtung, dass TEF-1 trotz seiner ubiquitären Expression während der embryonalen Entwicklung muskelspezifische Gene regulieren kann, war lange Zeit die Frage ungeklärt, ob TEF-1 eine transaktivierende Funktion besitzt. Erste Untersuchungen des NTEF-1 durch Transfektion in lymphoide Zellen, in denen das NTEF-1 normalerweise nicht exprimiert wird, ergaben keine Hinweise auf ein Aktivierungspotential. Diese Ergebnisse wurden wie folgt gedeutet: a) NTEF-1 wirkt als negativer TATA-assoziierter Faktor (Chaudary *et al.* 1994) oder b) ein positiv wirkender Faktor, der für die TEF-1 Transaktivierung benötigt wird, ist nicht in ausreichenden Mengen vorhanden (Xiau *et al.* 1991). Weitere Transfektionen von NTEF-1 und RTEF-1 in Zellen, in denen endogenes TEF-1 produziert wird, führte ebenfalls zu keiner Aktivierung, sondern zu einer Repression jener Reporter, die TEF Bindemotive enthielten (Xiau *et al.* 1991; Ishiji *et al.* 1992; Shimizu *et al.* 1993; Hwang *et al.* 1993; Stewart *et al.* 1994). Diese beobachtete Repression könnte jedoch auf die Existenz eines limitierten Überbrückungsfaktors zurückzuführen sein, der die Interaktion der Transkriptionsmaschinerie mit den TEF-Faktoren vermittelt. Diese Faktoren werden ebenfalls als Koaktivatoren oder TIFs (Transkriptions Intermediär Faktoren) bezeichnet. Proteine, die als solche Koaktivatoren zu wirken scheinen, konnten bereits für bestimmte Kernrezeptoren und den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP responsive element binding protein*) kloniert werden (Arany *et al.* 1994; Chiba *et al.* 1994; Guarente 1995; Luo und Roeder 1995; Meier 1996). Alle bisher isolierten Proteine sind jedoch nicht in die Gruppe der TATA Box Bindeprotein (TBP)-assozierten Faktoren (TAF) einzuordnen, die in höheren Eukaryoten feste Bindungen mit dem TBP eingehen und ein wichtiger Bestandteil der Transkriptionsmaschinerie darstellen (Tansey und Herr 1997). Eine solche Repression, die aus einer Konkurrenz der Koaktivatoren vom Promotor durch eine erhöhte Konzentration an transfizierten Transaktivatoren resultiert, wird als „Squelching“ bezeichnet und ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt bei der TEF-abhängigen Genaktivierung eine Rolle spielt, wurden Experimente mit GAL-TEF Chimären durchgeführt (Xiau *et al.* 1991; Hwang *et al.* 1993; Stewart *et al.* 1994; Yockey *et al.* 1996). Die DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 wurde dazu mit

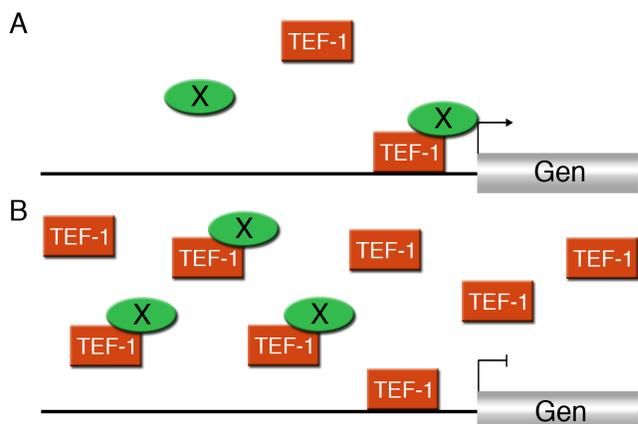


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Squelchings. (A) „Normaler“ Zustand, wobei die Transkriptionsfaktoren (TEF) und die Koaktivatoren (X) in zell-typischen niedrigen Konzentrationen vorliegen. Die beiden Proteine binden gemeinsam am Promotor des Zielgens und aktivieren die Transkription. (B) Nach einer Überexpression des Transkriptionsfaktors werden alle verfügbaren Koaktivatoren gebunden, wobei nur sehr wenige Koaktivatoren für die Bindung am Promotor

verbleiben. Die Transkription wird dadurch unterdrückt.

NTEF-1 und RTEF-1 fusioniert und die Chimärenaktivität mittels UAS_G (GAL4 Bindestelle) basierenden Reportern überprüft. Tatsächlich führten die Chimären zu einer 60fachen Erhöhung der UAS_G Reporteraktivität während es den Chimären immer noch möglich war TEF basierende Reporter zu reprimieren. Diese Repression fand zwar nicht mehr in dem Maße wie das TEF-1 *Squelching* statt, jedoch ist diese Verringerung auf einen geringeren Verbrauch an Koaktivator durch eine Koaktivator-unabhängige Interaktion des GAL-TEF mit der UAS_G Bindestelle zurückzuführen. Im Gegensatz dazu konnte, z.B. in den Promotoren des *hCS* (humanes Chorionsomatomammotropin) oder *Involucrin* Gens tatsächlich eine Funktion des TEF-1 als Repressor nachgewiesen werden und wird im Falle von *hCS* durch eine Konkurrenz mit dem Faktor CSEF-1 um die Bindung am Promotor bewirkt (Takahashi *et al.* 1995; Jiang und Eberhardt 1995).

2.3.4. Die VITO Gene sind eine neue Gruppe *vestigial* verwandter Proteine

Mit Hilfe der subtraktiven Hybridisierung konnte in der Arbeitsgruppe Braun ein humanes cDNA-Fragment (*hVITO-1*) isoliert werden, welches ausschließlich in humanen Skelettmuskeln exprimiert wird. Nach Sequenzierung der cDNA konnten hohe Homologien zum humanen *Tondu* und zum *Vestigial* (*Vg*) Gen in *Drosophila melanogaster* festgestellt werden. Besonders hohe Homologien zeigten sich dabei in einem Bereich, der im *Vg*-Protein für die Bindung des TEF homologen Proteins Scalloped verantwortlich ist, und deshalb als SID („*scalloped interaction domain*“) bezeichnet wurde (Simmonds *et al.* 1998; Halder und Carroll 2001) (siehe Abbildung 4).

Durch das Screening einer genomischen Mausbank sowie der Suche nach homologen Maus EST (*expressed sequence tag*) Klonen in der Datenbank des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) konnte schließlich ein potentieller Kandidat (*mVITO-1*) für das homologe Gen in der Maus gefunden werden (*RIKEN full-length enriched, 12 days embryo head; EST name: BB567795; GenBank gi: 11458703*).

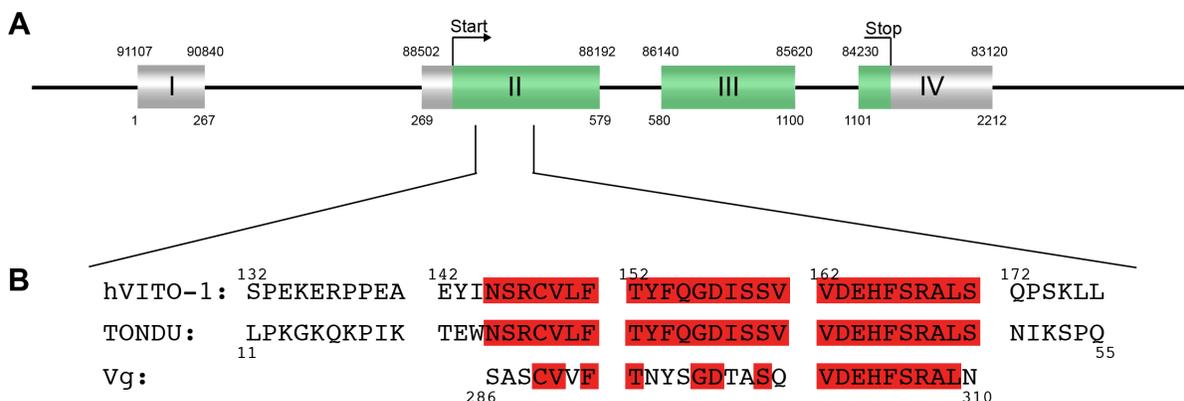


Abbildung 4. Die genomische Sequenz des *hVITO-1*. (A) Die Zahlen geben die Position der Abschnitte auf der cDNA (unten) und auf der genomischen Sequenz des PAC-Klons (oben; PAC 179P9) an. Der gesamte genomische Locus ist insgesamt 7.987 bp lang. (B) Der offene

Leserahmen (ORF) zwischen den Basen 293 und 1144 beinhaltet einen Bereich, welcher eine große Homologie zu der SID (Scalloped Interaktionsdomäne) in den Proteinen Vestigial (Vg) und TONDU (TDU; GenBank Acc: 137387) aufweist. Die Zahlen geben die Position der Aminosäure in der Proteinsequenz an.

Mit Hilfe von Northern-Blot- und *In-Situ*-Hybridisierungen, konnte anschließend das Expressionsmuster von *mVITO-1* identifiziert werden (Mielcarek *et al.* 2002). Die Northern-Blot-Analyse offenbart eine Expression im sich entwickelnden Embryo in den Stadien E12.5, E14.5 und E17.5 sowie in neugeborenen Mäusen im pränatalen Stadium P1. In adulten Geweben konnte ein starkes Hybridisierungssignal ausschließlich im Skelettmuskel nachgewiesen werden. In anderen Geweben, wie Leber, Niere und Herz erfolgte hingegen keine Expression. Zusätzlich konnten auch Transkripte von *mVITO-1* in proliferierenden C₂C₁₂ detektiert werden, wobei sich zeigte, dass die Expression in terminal differenzierten Myoblasten ca. doppelt so hoch war, wie in undifferenzierten C₂C₁₂ Zellen. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch im menschlichen Gewebe. Hier findet ebenfalls eine Expression ausschließlich in den Skelettmuskeln statt, wobei in schnellen Skelettmuskeln wesentlich stärkere Signale auftreten.

Für eine genauere Bestimmung der Expressionssignale wurden *In-Situ*-Hybridisierungen an Mäuseembryonen verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt (Abbildung 5). Die ersten Signale findet man hier ab E8.0 im 1. und 2. Kiemenbogen (Abbildung 5A-D) und später ab E9.5 in der

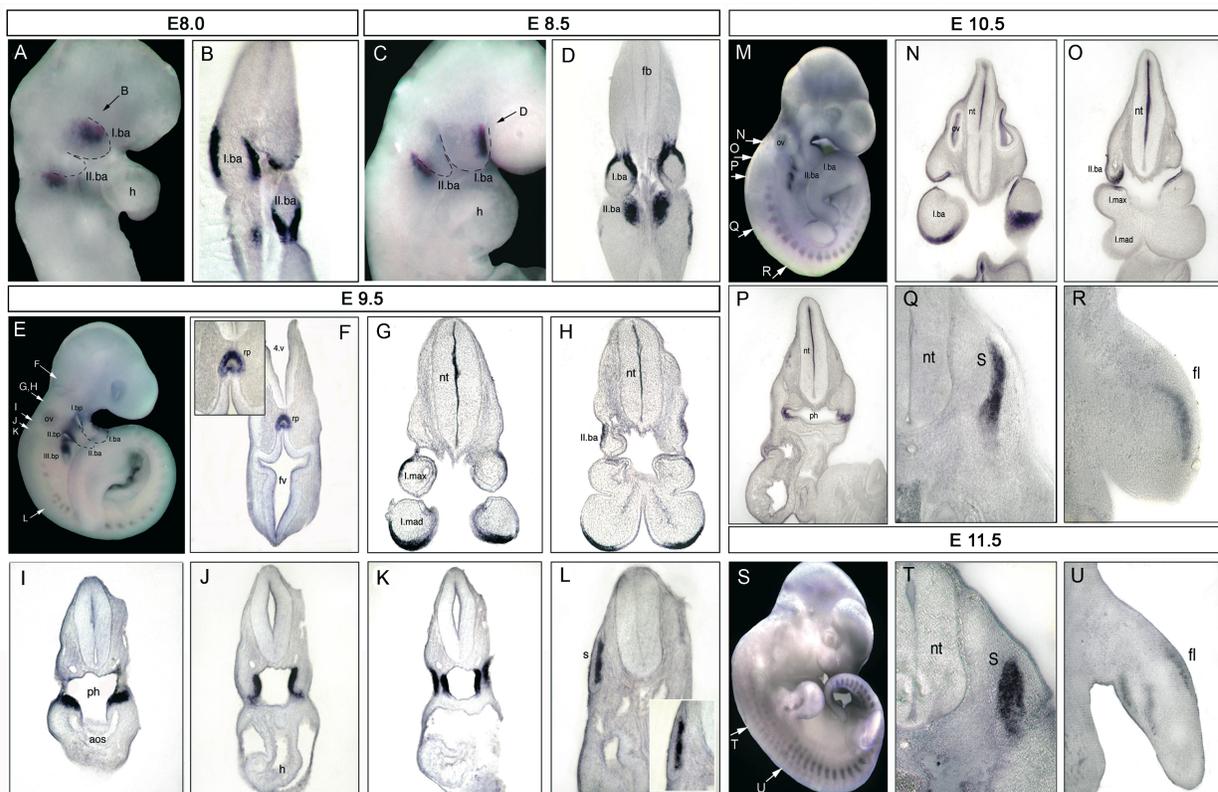


Abbildung 5. Whole-mount *in situ* Hybridisierung und Vibratonschnitte von *mVITO-1* in Mäusembryonen der Entwicklungsstadien E8.0 bis E11.5. Die Positionen der transversalen Vibratonschnitte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Eine Expression von *mVITO-1* ist zwischen E8.0

und E10.5 im 1. und 2. Kiemenbogen sichtbar (**A-H**; **M-O**) sowie bei E9.5 in der Rathkes Tasche (**F**). Weitere Signale zeigen sich am E9.5 in den Derivaten des cranialen Pharynx (**I-K**; **P**). Die Expression in den Somiten beginnt bei E9.5 und findet ausschließlich im Myotom statt (**L**; **Q**; **T**). Ab E10.5 zeigt sich zudem eine Expression in den vorderen Extremitäten (**R**, **U**). *ba*, Kiemenbogen; *h*, Herz; *nt*, Neuralrohr; *max*, maxillärer Teil des Kiemenbogens; *mad*, mandibulärer Teil des Kiemenbogens; *ph*, Pharynx; *aos*, Aortenbläschen; *s*, Somit; und *fl*, vordere Extremität. (Nach Mielcarek et al. 2004)

Rathkes Tasche (Abbildung 5F) sowie in den Derivaten des cranialen Pharynx (Abbildung 5I-K). Es zeigte sich außerdem, dass die muskelspezifische Expression von *mVITO-1* ausschließlich im Myotom zu finden ist. Die ersten Signale in den Somiten sind ab E9.5 erkennbar und bleiben bis E11.5 auf das Myotom beschränkt (Abbildung 5L, Q, T). Die Expression von *mVITO-1* ist dabei auf die cranialen Somiten begrenzt. Obwohl in migrierenden Vorläuferzellen keine Signale identifiziert werden können, zeigt sich ab E10.5 in den vorderen Extremitäten eine schwache Expression (Abbildung 5R, U). Ab dem Embryonalstadium E12.5 nehmen die Signale in den Somiten stark ab.

Aufgrund der hohen Homologien zwischen VITO-1 und TONDU bzw. Vestigial im Bereich der SID, wurden nochmals Screenings in EST-Datenbanken durchgeführt, um weitere verwandte Kandidaten zu identifizieren. Dabei wurde besonders auf Ähnlichkeiten im Bereich der SID geachtet. Es konnte ein EST-Klon mit einer 93%igen Homologie auf Aminosäureebene in der Interaktionsdomäne gefunden werden, wobei die Gesamthomologie nur 33% betrug (*Mus musculus RIKEN cDNA 1700110N18 gene*; *EST name: BC042696*; *cDNA clone IMAGE:3496297*). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu *mVITO-1* wurde dieses cDNA Fragment als *mVITO-2* bezeichnet. Auch für dieses Gen wurden in Mäusen *In-Situ-Hybridisierungen* zur Analyse des Expressionsmusters durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Expression von *mVITO-2* im Laufe der Embryonalentwicklung ausschließlich in den Somiten erfolgt

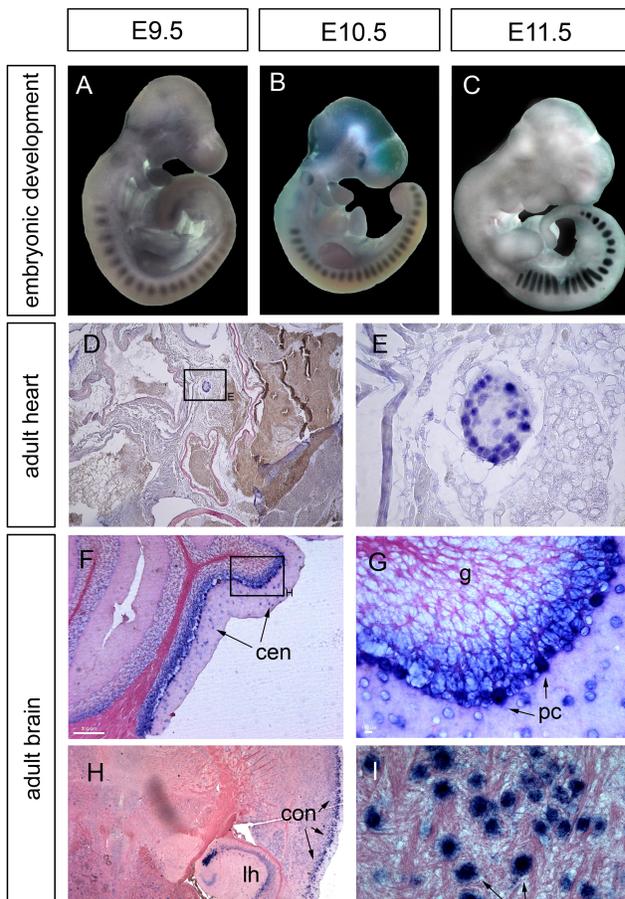


Abbildung 6. Whole-mount *In-Situ-Hybridisierung* verschiedener embryonaler Stadien und adulter Gewebe der Maus für *mVITO-2*. Zwischen E9.5 und E11.5 ist die Expression von *mVITO-2* auf die Somiten beschränkt (**A-C**). In adulten Geweben können Signale auf transversalen Schnitten des Herzens, im Bereich des Vorhofs identifiziert werden (**D, E**). Auch in

Purkinje-Zellen und weiteren Neuronen des Kleinhirns (G, H) sowie im limbischen Hippocampus (H) und Neuronen des Kortex (H, I) findet eine Expression von mVITO-2 statt. cen, Kleinhirn-Neurone; g, Gliazellen; con, kortikale Neurone pc, Purkinje-Zellen und lh, limbischer Hippo-campus. (Abbildung nach Mielcarek et al. unveröffentlicht)

(Abbildung 6A-C), während im adulten Organismus Signale in verschiedenen Geweben gefunden werden können. So findet man eine Expression in Neuronen im Bereich des Vorhofs adulter Herzen (Abbildung 6D-E) sowie in den Purkinje-Zellen und weiteren Neuronen im Kortex und im Kleinhirn (Abbildung 6F-I) adulter Mäuse.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *mVITO-1* und *mVITO-2* während der embryonalen Entwicklung hauptsächlich in Vorläuferzellen der Skelettmuskulatur aktiv sind. Die muskelspezifische Expression bleibt bei *mVITO-1* auch im adulten Organismus erhalten, da der Skelettmuskel das einzige Gewebe ist, in dem sich *mVITO-1*-Transkripte nachweisen lassen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass sowohl *mVITO-1* und *mVITO-2* bei der embryonalen Entwicklung der Skelettmuskeln involviert sind und *mVITO-1* möglicherweise auch noch im adulten Skelettmuskel benötigt wird. Die hohe Homologie im Bereich der SID, lässt vermuten dass diese Domäne große Bedeutung für die Funktion der VITO-Gene besitzt und daher evolutionär konserviert wurde. In vorangegangenen Studien konnte zudem bereits gezeigt werden, dass diese Domäne für die Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren der TEF-Familie benötigt wird (Paumard-Rigal *et al.* 1998). Zusammen mit den Expressionsdaten kann daher vermutet werden, dass die Mitglieder der VITO-Familie möglicherweise als Cofaktoren der TEFs, in die MCAT-abhängige Regulation muskelspezifischer Gene eingebunden sind.

Neben der Arbeitsgruppe Braun arbeitet noch eine weitere Gruppe um F.R. Stewart an der VITO Genfamilie. Die Transkripte werden von Stewart *et al.* als *vestigial like* bzw. *vestigial like homolog* (*Vgl* bzw. *VglI*) Gene bezeichnet (Maeda *et al.* 2002; Chen *et al.* 2004). Zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Nomenklatur sowie der Zuordnung weiterer EST-Klone wurden alle bislang identifizierten Kandidaten in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Bezeichnung der Klone erfolgt in dieser Arbeit nach der Nomenklatur der AG Braun. Eine nähere Erläuterung der Untersuchungen von Stewart *et al.* im Kontext mit dieser Arbeit erfolgt in der Diskussion.

Tabelle 3. Übersicht der Nomenklatur der VITO bzw. *vestigial like* Genfamilie sowie der Bezeichnungen weiterer identischer EST-Klone. In der ersten Zeile befindet sich die Nomenklatur, welche von Stewart *et al.* verwendet wird, wobei *VglI* als Kurzbezeichnung für *Vestigial like* verwendet wird. Nachstehend ist die Nomenklatur, wie sie von der AG Braun und in dieser Arbeit verwendet wird sowie weitere identische EST-Klone, die in der NCBI Datenbank gefunden wurden. (nach Maeda *et al.* 2002; Chen *et al.* 2004)

Nomenklatur Stewart <i>et al.</i>	<i>mVgl(l)-1</i>	<i>mVgl(l)-2</i>	<i>mVgl(l)-3</i>	<i>mVgl(l)-4</i>	<i>hVgl(l)-1</i>	<i>hVgl(l)-2</i>	<i>hVgl(l)-3</i>
Nomenklatur AG Braun	<i>m-Vgr</i>	<i>mVITO-1</i>	<i>mVITO-2</i>	-	<i>hTONDU</i>	<i>hVITO-1</i>	<i>hVITO-2</i>

andere EST-Klone	AA474871	BY752582	XP283372	BC060305	AF137387	BC100798	BC094780
	AA571483	BY752534 BB649129 BB662575	CN663801 CK794393 CF904858 BG804656 BE332707 BE285904 CN676812 BU917950	BC048841		BC100799 BC118622 BC069316	BC062478

2.4. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit diene der *in vivo* und *in vitro* Charakterisierung der muskelspezifischen transkriptionellen Co-Regulatoren der VITO-Genfamilie. Durch *in vitro* Untersuchungsmethoden, wie EMSA, Reporter-Assays oder Co-Immunopräzipitation sollte eine nähere biochemische Charakterisierung der VITO-Gene erfolgen, während die Generierung von genetisch veränderten Mäusen, in denen essentielle Teile des Transkripts konditionell deletiert wurden, eine Untersuchung der biologischen Funktion der Proteine im lebenden Organismus erlaubte. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, eine *Pax7* defiziente Mauslinie zu generieren, die eine räumliche und zeitliche Deaktivierung des Gens erlaubt, um die genaue Funktion des Transkriptionsfaktors für die Aufrechterhaltung und Determinierung der Satellitenzellpopulation und die damit verbundene Beeinflussung der Muskelregeneration untersuchen zu können. Abschließend sollte ein Screening einer pharmakologisch aktiven Stoffbibliothek auf die Beeinflussung der terminalen Differenzierung von C₂C₁₂ Myoblasten erfolgen. Ziel war es, potentielle chemische Aktivatoren oder Inhibitoren zu identifizieren, die eine genaue Untersuchung der Myogenese erlauben und möglicherweise therapeutische Ansätze zur Behandlung von Muskelerkrankungen bieten.

3. Material

3.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden – wenn im Text nicht anders bezeichnet - bei den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), New England Biolabs (Schwalbach), Invitrogen (Leek, NL), Promega (Mannheim), Stratagene (Heidelberg) und Boehringer (Mannheim) verwendet. Radioaktive Substanzen wurden von Amersham Biosciences bezogen.

[³⁵ S]-Methionin	Amersham Biosciences
α[³² P]-dCTP	Amersham Biosciences
8-Hydroxychinolin	Merck
ATP	Boehringer (Mannheim)
BCIP	Boehringer (Mannheim)
Bromphenolblau	Merck
BSA	New England Biolabs
Chlorophan	Roth
Digoxigenin Antikörper	Fab-Fragmente; Boehringer
Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL
IPTG	Roth
Luciferin	Sigma (Deisenhofen)
Lysispuffer Zellkultur	AppliChem
Messpuffer	AppliChem
Methionin	Roth
Natriumsalicylat (C ₇ H ₅ NaO ₃)	Roth
NBT	Boehringer (Mannheim)
Paraformaldehyd	Sigma (Deisenhofen)
Ribonukleotid Triphosphate	Boehringer (Mannheim)
Schaf- / Pferde-Serum	Sigma (Deisenhofen)
SDS	Bio-Rad (München)
Sepharose G	Amersham Biosciences
t-RNA	Boehringer (Mannheim)
X-Gal	Sigma (Deisenhofen)

3.2. Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer
Klenow-Fragment	Promega
Proteinase K	Roth
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs; Jena Biosciences
Rnase A	Boehringer
RNAsin	Promega
T3 RNA-Polymerase	Promega
T4 DNA Ligase	Fermentas
T4 Polynukleotid Kinase	Boehringer
Taq DNA Polymerase	Eppendorf

3.3. Standardlösungen und Stammlösungen

Alle Standardlösungen und Stammlösungen sind - wenn nicht im Text näher erläutert - im Anhang aufgeführt.

3.4. Verbrauchsmaterial

Einmalfilter NML (0,45- und 0,20 μm)	Sartorius (Göttingen)
Filterpapier 0858	Schleicher, Schüll
Petrischalen	Nunc, Greiner
Reaktionsgefäße, Plastikwaren	Greiner, Nunc, Sarstedt, Schütt
Röntgenfilme	Fuji, Kodak
3MM Chromatography Paper	Whatman

3.5. Verwendete "Kits"

Nucleobond AX 500 Maxi Kit	Macherey-Nagel
Nucleospin Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel
DNA Cycle Sequencing Kit	Abi, Weiterstadt
TnT [®] Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
Creatine Kinase Reagent (UV-Kinetic)	BioQuant, San Diego

3.6. Verwendete Bakterienstämme

<i>XL1-Blue</i>	<i>Stratagene; SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-; F-[proAB+ lac^f lacZΔM15 Tn10 (Tet^r)];</i>
<i>DH10B</i>	<i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ΔlacX74 deoR endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 rpsL recA1 nupG Φ80dlacZΔM15 galU galK</i>
<i>DY380</i>	<i>DH10B [λc1857 (cro-bioA<>Tet] galk⁺ gal490</i>
<i>EL350</i>	<i>DH10B [λc1857 (cro-bioA<><>araC-P_{BAD}Cre]</i>
<i>SW104</i>	<i>EL350 gal⁺</i>
<i>SW106</i>	<i>SW104 ΔgalK</i>
<i>JM110</i>	<i>Stratagene; rpsL thr leu thi hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺)lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 ⊗(lac-proAB) [F' trad36 proAB lac^fZΔM15]</i>

3.7. Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Organismus	Morphologie	Gewebe	ATCC-Nr.
C ₂ C ₁₂	Maus	Myoblasten	Muskel	CRL-1772
HEK293	Mensch	Nierenzellen	Embryo, Niere	
NIH 3T3	Maus	Fibroblasten	Embryo	CRL-1658
C3H/10T _{1/2}	Maus	Fibroblasten	Embryo	CCL-226

3.8. Southern Proben für Genotypisierung

Verwendung	Bezeichnung	Erläuterung
Pax7 K.O.	Sonde 3.4	614bp PCR-Fragment (<i>Pax7 Sonde 3.4 fw; Pax7 Sonde 3.4 rev</i>) in <i>pGEM-T-EASY</i> ; Verdau mit EcoRI
Pax7 K.O.	Sonde 5.1	678bp PCR-Fragment (<i>Pax7 Sonde 5.1 fw; Pax7 Sonde 5.1 rev</i>) in <i>pGEM-T-EASY</i> ; Verdau mit EcoRI
VITO-2 K.O.	Sonde III	505bp Fragment aus Konstrukt #59 (<i>VITO-2 3'-Fragment in pucV2</i>) durch gemeinsamen Verdau mit HindIII, AatII und ApaI
div.	Neo-Sonde	640bp Fragment aus <i>pKJ-1 neo</i> durch PstI Verdau

3.9. Verwendete Oligonukleotide

3.9.1. Oligonukleotide für Genotypisierungen und Sonden

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5'=>3')
Vito2 wt fw	GGT TGA GTT CGA CTG TCT TGC
Vito2 wt rev	GAC ACT GAA AGA GCT CTT AAG AAC
Vito2 flp fw	CTC CGT GGC TTA ATG CTA GTG
Vito2 flp rev	CTC TGA AGC TGT CCT TAA TAG GC
Pax7 wt fw	CTG CGT TTC TCC GAG CTG CAG
Pax7 wt rev	GCC CGC TGT GTA GGA AAG CC
Pax7 flp fw	GGG GAT GCT AAG GAA GTT AAC C
Pax7 flp rev	CTC TCC TGG GGC AGG TCT TTC
Pax7 sonde 3.4 fw	AGG AAA GGG GAC AAA AAG AGG ATT
Pax7 sonde 3.4 rev	CCA CAG GCC AGG GTT CAT
Flp fw	CTG GAG GAT AAC TTG TTT ATT GC
Flp rev	CTA ATG TTG TGG GAA ATT GGA GC
Cre fw	AGG CTA AGT GCC TTC TCT ACA C
Cre rev	GAC CAG GTT CGT TCA CTC ATG G

3.9.2. Oligonukleotide für Klonierungen

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5'=>3')
Vito2 BstAPI loxP fw	TTG ACG ATC GAC CGG TAT AAC TTC GTA TAG CAT ACA TTA TAC GAA GTT ATG CGC GCT CAA GGT
Vito2 BstAPI loxP rev	TTG AGC GCG CAT AAC TTC GTA TAA TGT ATG CTA TAC GAA GTT ATA CCG GTC GAT CGT CAA ACC
Pax7 BsaAI loxP fw	CTC ATA TGT ACA TAA CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CGA AGT TAT AC
Pax7 BsaAI loxP rev	GTA TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA CGA AGT TAT GTA CAT ATG AG
Box1_fw	TAC CTC GAG CGA TCA TTC CAC ATG CGA TCA TTC CAC ATG CGA TCA TTC CAC ATG CGA TCA TTC CAC ATG
Box1_rev	ATG CTC GAG CAT GTG GAA TGA TCG CAT GTG GAA TGA TCG CAT GTG GAA TGA TCG CAT CTG GAA TGA TCG

3.9.3. Oligonukleotide für EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5'=>3')
Bs01 fw	CCG GCG ATC ATT CCA CAT G
Bs02 fw	CCG GCG ATC ATT CCC CAT G
Bs03 fw	CCG GCG ATC ATT CCT CAT G
Bs01 rev	CCG GCA TGT GGA ATG ATC G
Bs02 rev	CCG GCA TGG GGA ATG ATC G
Bs03 rev	CCG GCA TGA GGA ATG ATC G

3.9.4. Oligonukleotide für Sequenzierung und Klonierungskontrolle

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5'=>3')
Control box1	ATG CTC GAG CAT GTG GAA TGA TC
Control fw	CTA ACA TAC GCT CTC CAT CAA AAC
Sp6-Primer	CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG
T7 Primer	CGC GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG
T3 Primer	ATT AAC CCT CAC TAA AG
pKOII-DTA (#332)	ACT GAT GAA TGG GAG CAG TGG TG
pKOII-DTA rev	CAC TTG TGT AGC GCC AAG TGC C
pKOII-long (#265)	CAG GGT TAT TGT CTC ATG AGC GG
pKOII-long rev	GGT GGG GTG GGA TTA GAT AAA TGC
Vito2 5'arm fw	GTC GGT GTT CTC TCA CTG GC
Vito2 5'arm rev	GGC GCT CTA AGC GCT GGC G
Vito2 3'arm rev	CAT TCT GTT AAC CTG GCC AGC
Vito2 loxP contr.	GTT CGA ATG TGT GTG CTA TAC
Pax7 5'arm fw	GCT CTG CCA CAG GAG ATA G
Pax7 5'arm rev	ACA CAT CCG GCA GCT TCC
Pax7 3'arm fw	GGG ATG CTA AGG AAG TTA ACC
Pax7 3'arm rev	GGA AGT ATG AGA GAG ATA TCC
Pax7 loxP contr.	GAT TTG CCA GCA TCT CTG G

3.10. Verwendete Mauslinien

<i>CMV Cre-Deleter</i>	Die konstitutive Cre-Rekombinaseexpression in dieser Mauslinie vermittelt die Exzision aller geflochten DNA 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 Kaninchen getrieben (auch CAGG genannt; Niwa <i>et al.</i> , 1991; Thomsen <i>et al.</i> , 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 <i>et al.</i> , 1995). Freundliche Gabe von Klaus Rajewsky über H. von Melchner (Universität Frankfurt).
<i>TG Flp-Deleter</i>	Die konstitutive Flp-Rekombinaseexpression wird durch ein humanes β -Aktin Enhancer-Element angetrieben und vermittelt eine Rekombination zwischen Flp-Erkennungssequenzen in der frühen Embryogenese (Rodrigues <i>et al.</i> 2000). Freundliche Gabe von S.M. Dymecki (Boston).
<i>ICR</i>	Harlan-Winkelmann (Paderborn)
<i>C57BL/6J</i>	Harlan-Winkelmann (Paderborn)

3.11. Verwendete Vektoren

<i>pBluescript KSII+ (pKSII+)</i>	(GenBank-Nr.: X52327 [KS(+)]; Stratagene, Heidelberg)
<i>pGEM-T-Vektor</i> ; <i>pGEM-T-EASY-Vektor</i>	Promega, Heidelberg
<i>pCS2 + MT</i> ; <i>pCS2 NLS + MT</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Braun
<i>pTA-Luc</i>	BD Biosciences
<i>pT7βSal</i>	(Norman <i>et al.</i> 1988)
<i>pRSV-β-Gal</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Braun
<i>pTA-Luc Myc</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Karen Ruschke
<i>pXJ40 mTEF-1</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. Davidson, Strasbourg
<i>pXJ40 mTEF-3</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. Davidson, Strasbourg
<i>pIRES2-EGFP</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Karen Ruschke

<i>pKJ-1 neo</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Mike McBurney, Ottawa (Adra <i>et al.</i> 1987)
<i>puc18</i>	(GenBank-Nr.: L09136; Fermentas)
<i>pk-11</i>	(Meyers <i>et al.</i> 1998)
<i>pKOII-DTA</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Nabeel Bardeesy, Boston
<i>pBluescript I SK(+) mVITO-1</i>	RIKEN Fantom-Datenbank: BB649129
<i>pCMV-Sport6 mVITO-2</i>	RIKEN Fantom3-Datenbank: BC042696
<i>pT7βSal myf5;</i> <i>pT7βSal E2-2</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Bober
<i>pBluescript λPax7</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Mansouri
<i>Lawrist7 mVITO-2</i>	RZPD-Klon: MPMGc121D16799

3.12. Verwendete Antikörper

3.12.1. Erst-Antikörper

Name	Wirt	Quelle
<i>Myc 1-9E10.2</i>	<i>Maus</i>	<i>Hybridoma Zellstock ATCC CRL-1729 (1:10)</i>
<i>Anti-TEF-1</i>	<i>Maus</i>	<i>BD Biosciences Pharmingen (1:250)</i>
<i>Anti-E2-2</i>	<i>Maus</i>	<i>freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Braun</i>
<i>MF20</i>	<i>Maus</i>	<i>freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Svetlana Oustanina (1:20)</i>
<i>Anti-RalA</i>	<i>Maus</i>	<i>BD Biosciences Pharmingen (1:3000)</i>
<i>Anti-CD34</i>	<i>Ratte</i>	<i>eBioscience (1:200)</i>
<i>Chicken Anti-Pax7</i>	<i>Maus</i>	<i>Developmental Studies Hybridoma Bank (352-523) (1:10)</i>
<i>Mouse Anti-Pax7</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>GeneTex (GTX77888) (1:250)</i>

3.12.2. Zweit-Antikörper

<i>Hrp anti-mouse</i>	<i>Pferd</i>	<i>Cell Signaling Technology (1:3000)</i>
<i>Biotin anti-rat</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>Vector (1:150)</i>
<i>Alexa 594 anti-mouse</i>	<i>Hühnchen</i>	<i>Invitrogen (1:1000)</i>
<i>Hrp anti-mouse IgG; TrueBlot</i>		<i>eBioscience (1:10000)</i>

4. Methoden

Zell- und molekularbiologische Standardverfahren wurden, soweit im Text nicht näher erwähnt, folgenden Standardwerken entnommen:

Current Protocols in Molecular Biology;

F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl;
Wiley Interscience, 1989

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition;

J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis;
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

Gene Targeting: A Practical Approach;

A.L. Joyner;
Oxford University Press, 1993

Manipulating the Mouse Embryo;

B. Hogan, R. Beddington, F. Costantini, E. Lacy;
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994

The Atlas of Mouse Development;

M. H. Kaufman;
Academic Press, 1999

4.1. Sterilisation von Lösungen und Geräten

Für das Arbeiten mit RNA, DNA, Zellkulturen sowie für die Durchführung enzymatischer Reaktionen werden sterile Materialien benötigt, um Reaktionen mit der gewünschten Effizienz durchzuführen bzw. eine Kontaminierung mit Mikroorganismen zu verhindern. Glaswaren wurden bei trockener Hitze mit 180 °C sterilisiert. Plastikwaren, Lösungen und Medien wurden bei 121°C und einem Druck von 2,2 bar für 30 min. autoklaviert. Nicht hitzestabile Lösungen wurden durch Filtration durch Zelluloseacetatfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm bzw. 0,45 µm sterilisiert.

4.2. Konstruktion eines konditionalen “Targeting”-Vektors

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).

Das wichtigste Werkzeug dafür ist die aus dem Phagen *P1* stammende Cre-Rekombinase. Sie bindet palindromische Erkennungssequenzen, die als loxP-Sequenzen (*locus of X-ing-over*) bezeichnet werden (Sternberg and Hamilton, 1981). Die Exzision eines bestimmten DNS-Abschnitts, kann mit Hilfe der Cre-Rekombinase durch zwei flankierende loxP-Sequenzen der gleichen Orientierung vermittelt werden (Sauer and Henderson, 1988). Nach erfolgreicher Deletion dieses von loxP-Sequenzen flankierten (geflochten) Bereichs, verbleibt eine loxP-Sequenz am Ort der Exzision zurück. Die Inversion eines geflochten Bereichs wird möglich, indem die Orientierung der flankierenden loxP-Sequenzen gegenläufig gewählt wird. Chromosomentranslokationen können, durch die Platzierung der loxP-Sequenzen auf 2 unterschiedlichen Chromosomen, forciert werden. 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.

Ausgangspunkt für die Herstellung des “Targeting”-Vektors war der *pKOII-DTA* Vektor, welcher bereits eine FRT-flankierte Neo-Kassette und eine loxP-Erkennungsstelle enthält. Die Neo-Kassette enthält das Gen für die Neomycinphosphotransferase, die eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 verleiht, und somit als Selektionsmarker für genomische Rekombinationsereignisse dient. Angetrieben wird die Neomycin-Resistenz durch regulatorische Elemente der Phosphoglyzerat-Kinase 2. Die flankierenden FRT-Sequenzen ermöglichen, ähnlich wie die loxP-Sequenzen und die Cre-Rekombinase, eine spätere Entfernung des Resistenzgenes durch Flp-Rekombinase. Die loxP-Erkennungsstelle ist das erste Element für die spätere Cre-abhängige Deletion der gewünschten Exone.

In die multiplen Klonierungsstellen (MCS), die sich 5' und 3' der Neo-Kassette befinden, werden die genomischen Fragmente kloniert, welche die spätere locus-spezifische Rekombination in den

embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) ermöglichen. Dabei wird je ein langer (ca. 10 kb) und ein kurzer (ca. 2 kb) rekombinogener Arm eingefügt um einen asymmetrischen "Targeting"-Vektor zu schaffen. Diese asymmetrische Verteilung - relativ zur PGK-NEO Kasette - hat sich als die beste Methode erwiesen, um eine genügend hohe Wahrscheinlichkeit zur locus-spezifischen Rekombination zu erzeugen ohne dabei einen Doppelstrangbruch in einem der beiden Arme zu verursachen. Die im Targeting-Vektor vorhandene Sequenz des Diphtherietoxins A (DTA) dient als negativer Selektionsmarker zusätzlich der Erhöhung der Rekombinationseffizienz. Sie gewährleistet, dass nach erfolgter Rekombination im langen Arm vor der Neo-Kasette auch eine Rekombination im kurzen Arm, zwischen Neo- und DTA-Kasette, erfolgt ist und somit keine Reste des Vektors in den Locus rekombiniert sind. In einem solchen Falle würde die rekombinierte DTA-Sequenz zur Bildung des Diphtherietoxins A und somit zum Tod der ES-Zelle führen.

Die für die spätere Deletion notwendige zweite loxP-Erkennungsstelle wird auf dem langen rekombinogenen Arm in den Intron-Bereich vor das/die entsprechende(n) Exon(e) kloniert. Durch die Cre-Rekombinase wird somit später der Bereich zwischen dieser loxP-Sequenz, einschließlich der Neo-Kasette, deletiert. Nach Sequenzanalyse des fertig gestellten "Targeting-Vektors" wurde das Konstrukt an der am Ende des langen Arms gelegenen NotI Schnittstelle linearisiert und für die Elektroporation aufgereinigt.

4.3. Kultur, Transformation und Selektion von ES-Zellen der Maus

Pluripotente, embryonale Stammzellen der männlichen Linie R1 (Nagy *et al.* 1993) wurden in ES-Zellmedium kultiviert. Für die Transfektion wurden die aufgereinigten "Gene Targeting"-Vektoren durch NotI-Restriktionsverdau linearisiert, das Restriktionsenzym anschließend für 20 Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert und das DNA-Fragment nach Ethanolpräzipitation in 1xTE gelöst. Für die Elektroporation (BioRad Genepulser mit 500µF und 240V) der vereinzelt ES-Zellen in einer PBS-Suspension wurden 25µg des linearisierten "Gene Targeting"-Vektors eingesetzt. Die transformierten Zellen wurden auf mit Gelatine (0.1%) überzogenen Kulturplatten für 8-10 Tage mit G418 (250µg/ml) selektioniert. G418 resistente ES-Klone wurden isoliert und auf Muldenplatten überführt, die entweder für die spätere DNA-Isolierung mit Gelatine (0.1%) oder zur Expansion der ES-Zellen mit mitotisch inaktivierten (Mitomycin C) primären Maus Fibroblasten beschichtet waren. Ein Teil der Zellen wurde für die Analyse durch Southern-Blot verwendet. Da die Rekombination im langen Arm vor oder hinter der einzelnen loxP-Sequenz erfolgen kann, wurden die positiven Klone per PCR auf die Anwesenheit der loxP- Erkennungsstelle überprüft. ES-Klone mit richtigem Rekombinationsereignis wurden expandiert, tiefgefroren (5×10^6 Zellen/ml) und bis zur Injektion in C57BL/6-Mausblastozysten in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.4. Herstellung und Haltung transgener Mäuse

Mausblastozysten-Injektionen und Embryo-Transfers wurden von Susanne Kreuzer im Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung durchgeführt. Es wurden hierbei je 15-20 ES-Zellen in Mausblastozysten des Inzuchtstammes C57Bl/6 injiziert und je 8-10 Blastozysten in scheinschwangere C57Bl/6 Mäuse transplantiert. Die chimären Nachkommen und in C57Bl/6 rückgekreuzte Folgegenerationen wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz in dafür vorgesehenen Räumen in der Versuchstierhaltung des MPI gehalten. Die behördliche Zulassung der transgenen Manipulationen erfolgte durch das Regierungspräsidium Giessen.

4.5. Genotypisierung der mutanten Mauslinien

Mausschwanzbiopsien wurden mit Proteinase K (1mg/ml) in TENS-Puffer bei 55°C verdaut. Nach Präzipitation in 0.8 Volumina Isopropanol und Waschen in 70% Ethanol wurde die genomische DNA in 50-100µl sterilem H₂O-Millipore gelöst. Für die Genotypisierung durch Southern-Blot wurden 20µl der DNA-Lösung verwendet, während zur PCR-Analyse 2µl einer 1:10 Verdünnung eingesetzt wurden.

Ein 10µl PCR-Ansatz enthielt PCR-Puffer (Eppendorf), 2mM MgCl₂, dNTP-Mix (0.2mM pro Nukleotid), spezifische Sinn- und Gegensinn-Oligonukleotide (jeweils 100 pmol), 0.2U *Taq*-Polymerase, und ddH₂O. Einer initialen Denaturierung (10 min., 95°C) folgten 20-35 Zyklen mit je 30s, 95°C (Denaturierung), 30s, 61-68°C (Oligonukleotid-Anlagerung), 1 min./Kb, 72°C (Extension). Nach dem letzten Zyklus wurde eine finale Extension (5 min. bei 72°C) durchgeführt.

4.6. Proteinexpression in Retikulozyten Lysaten

Die gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation ermöglicht die Herstellung der Expressionsprodukte von klonierten Genprodukten. Dazu wird die gewünschten cDNA in spezielle Expressionsvektoren, wie z.B. *pT7-b-Sal* oder *pCS2* kloniert, die alle notwendigen Bedingungen zur Transkription und Translation der gewünschten cDNA in eukaryotischen Zellen erfüllen.

Während dieser Arbeit wurde ein Kaninchen Retikulozyten Lysate System (TnT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega) verwendet. Aus Retikulozyten, d.h. unreifen Erythrozyten wurde ein Zellextrakt gewonnen, der zur zellfreien Synthese von Proteinen verwendet werden kann (Nicholl 1994).

Für die Transkription mittels T7 oder T3 RNA-Polymerase musste das Konstrukt in linearisierter Form vorliegen. Die klonierten Vektoren besitzen hierfür Erkennungssequenzen für selten schneidende Restriktionsenzyme im Polylinker 3' der Klonierungsstelle. Bei einer Transkription mit Hilfe der Sp6-RNA-Polymerase war dies nicht nötig, da für die Translation die zirkuläre Form des Templates die besten Resultate zeigt.

Nach erfolgter Konzentrationsabschätzung der linearisierten DNA mit Hilfe photometrischer Messung wurden die einzelnen Komponenten des TnT Coupled-Systems (*Transkription n' Translation*) nach folgendem Schema pipettiert:

25 μ l	TnT Retikulozyten Lysat
2 μ l	TnT Puffer
1 μ l	RNA-Polymerase [10U/ μ l]
1 μ l	RNasin [39U/ μ l]
1 μ l	DNA Template [1 μ g/ μ l]
1 μ l	Aminosäure-Mix (-Methionin) [1mM]
2 μ l	Methionin [1mM]
2,5 μ l	CAP-Strukturanalog (m ⁷ G(5')ppp(5')G) [10mM]
14,5 μ l	H ₂ O
50 μ l	Gesamtvolumen

Die Reaktion wurde je nach benötigter RNA-Polymerase (T3, T7 oder Sp6) für 90 bzw. 120 min. bei 30°C inkubiert. Eine Lagerung der translatierten Proteine kann bei -20°C erfolgen, jedoch wurden zur Co-Immunopräzipitation nur frische Translationsansätze verwendet.

Zur Überprüfung der Translation des Fusionsproteins bzw. für die Durchführung der Co-Immunopräzipitation wurden die Proteine radioaktiv markiert, um einen autoradiographischen Nachweis zu ermöglichen. Dazu wurde a[³⁵S]-Methionin [10 μ Ci/ μ l] anstatt des unmarkierten Methionins verwendet. Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben.

4.7. Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation wird zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt. Dabei wird die Unlöslichkeit eines sich bildenden Immun-Komplexes - bestehend aus Protein und monoklonalem Antikörper, welcher an Protein G Sepharose-„Beads“ (Pharmacia) bindet - ausgenutzt.

Zum Nachweis der Interaktion wird das zu untersuchende Protein mit dem potentiellen Interaktionspartner gemischt und inkubiert. Findet dabei eine Bindung statt, bleibt auch nach den folgenden Wasch- und Präzipitationsschritten der Interaktionspartner am Immuno-Komplex gebunden und beide Proteine können in der anschließenden Autoradiografie nachgewiesen werden. Findet jedoch keine Interaktion statt, wird das ungebundene Protein in den Waschschrinen entfernt und es kann in diesem Falle nur das zu untersuchende Protein in der Autoradiografie detektiert werden.

Ist - wie in dieser Arbeit vorliegend - kein spezifischer Antikörper gegen das zu untersuchende Protein vorhanden, gibt es die Möglichkeit mit Expressionsvektoren zu arbeiten, welche die Sequenz für ein

Antigen enthalten. Das zu exprimierende cDNA-Fragment wird im korrekten Leseraster an die antigencodierende Sequenz kloniert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die cDNA des zu untersuchenden Proteins so kloniert, dass nach der Translation ein Fusionsprotein mit 111 zusätzlichen Aminosäuren am C- bzw. am NH₂-Terminus translatiert wurde. Diese 111 AS codieren die sechsfache Sequenz des „myc-tag“ Epitopes, wogegen ein monoklonaler Antikörper existiert, welcher aus Hybridoma-Zellen gewonnen wird.

4.7.1. Darstellung des Myc1-9E10.2 Antikörpers

Der Hybridoma Zellstock ATCC CRL-1729 (*American Type Culture Collection*) für die Darstellung des monoklonalen Antikörpers Myc 1-9E10.2 wurde im Medium (1xDMEM/ 10% FKS) bei 37°C mit 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und für weitere 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde abgezogen und die restlichen Zellen abzentrifugiert. Der nun im Kulturüberstand enthaltene Antikörper konnte direkt für weitere Experimente eingesetzt oder durch eine Ammoniumsulfat-Fällung und chromatographische Methoden konzentriert bzw. aufgereinigt werden. Der Antikörper wurde bei 4°C gelagert.

4.7.2. Immunopräzipitation

Da die Menge der bei der *in vitro* Transkription und Translation gebildeten Proteine schwanken kann, wurden alle gebildeten Produkte auf ein denaturierendes SDS-Gel aufgetragen. Nach anschließender Autoradiografie, konnte die Menge an gebildetem Protein anhand der Stärke der Bande abgeschätzt werden.

Für den Interaktionsnachweis wurden gleiche Mengen an Translationsprodukt eingesetzt, wobei vom am wenigsten gebildeten Protein 20 µl Translationsansatzes eingesetzt wurden.

Die Inkubation der Proteine erfolgte für 15 min. bei 4°C auf dem Drehrad (10 U/min.). Im nächsten Schritt wurde 1 Volumen an Solubilisierungs-Puffer sowie 1 µl pre-Immunsereum (Pferde-Serum) zum Ansatz gegeben.

Die Sepharose-Beads wurden durch dreimaliges Waschen mit Solubilisierungs-Puffer equilibriert und im Volumenverhältnis von 1:1 mit Solubilisierungs-Puffer versetzt („slurry“). 35 µl dieser Sepharose-Mischung wurden anschließend zum Inkubationsansatz gegeben und für 30 min. bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach 15 sek. Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend 5 µl Antikörper hinzu gegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Präzipitation des Fusionsproteins der Myc-Antikörper sowie der TEF-1 Antikörper und für die Positivkontrolle (Myf5/E2-2) der E2-2 Antikörper verwendet. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 45 min. bei 4°C auf dem Drehrad. Zur Präzipitation wurden wiederum 35 µl Sepharose-„Beads“ (slurry) zum Inkubationsansatz gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend 3x mit dem Solubilisierungs-Puffer gewaschen und abschließend in 40 µl 2x SDS-Lade-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen, auf ein denaturierendes 4-12% SDS-Polyacrylamid-Gel (NuPage Bis-Tris; Invitrogen) wurden die Proben für 5 min. bei 95°C

aufgekocht. Nach der elektrophoretischen Trennung wurde das Proteingel 30 min. in 40% Methanol / 10% CH₃COOH-Lösung fixiert, 30 min. gewässert und 30 min. in 1M Na-Salicylat-Lösung inkubiert. Nach dem Vakuum-Trocknen wurde das Gel über Nacht bei -80°C autoradiographisch exponiert.

4.7.3. Immunopräzipitation mit überexprimierten Proteinen aus Zell-Lysaten

Da die zur *in vitro* Translation verwendeten Expressionskonstrukte neben den Sp6 Promotor auch einen eukaryotischen sCMV IE94 Promoter besitzen, konnten diese auch zur Überexpression der cDNAs in eukaryotischen Zellen verwendet werden.

Hierzu wurden je 150.000 HEK293 Zellen mit 2µg der entsprechenden zirkulären Plasmide transfiziert (siehe 4.10.2. Transfektion (Morgan und Darling 1994)) und nach 48stündiger Inkubation mit NP40-Lysis-Puffer geerntet. Die Gesamtproteinmenge des Lysats wurde durch die Lowry-Methode (BioRad DC Protein Assay) ermittelt und jeweils 500µg in 200µl Lysis-Puffer für die Immunopräzipitation eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation mit Sepharose bei 4°C auf dem Drehrad wurde der Ansatz für 20 Sekunden bei 12.000g zentrifugiert um unspezifische Präzipitationen mit der Sepharose auszuschließen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für eine weitere Stunde mit 10µl TEF-1 bzw. 20µl Myc-Antikörper bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach Zugabe von 35µl Sepharose erfolgte eine weitere Inkubation bei 4°C über Nacht auf dem Drehrad. Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliges Waschen mit dem NP40-Lysis-Puffer, wobei jeweils für 20 Sekunden bei 12.000g zentrifugiert wurde. Der Überstand nach dem ersten Waschschrift wurde für die Analyse mit 100µl Protein-Ladepuffer (mit 5% DTT) denaturiert und jeweils 6µl auf ein SDS-Gel aufgetragen, was gemessen an der Ausgangskonzentration einer Proteinmenge von 10µg entspricht. Das Sepharose-Pellet wurde nach den Waschsritten in 50µl Protein-Ladepuffer (mit 5% DTT) aufgenommen, für 5 Minuten bei 95°C gekocht und jeweils 1µl (~10µg) bzw. 10µl (10facher Überschuss) auf das SDS-Gel aufgetragen. Die abschließende Analyse erfolgte durch einen Western Blot.

4.7.4. Western Blot

Je nach Experiment wurden unterschiedliche Proteinmengen aus Protein-Präparationen in 2x SDS-Ladepuffer für 5 min. bei 95°C denaturiert und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (NuPage 4%-12% Bis-Tris, Invitrogen). Der Nass-Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte bei 30V für 2h (XCell II Blot Module, Nitrocellulose Membran, Invitrogen) in Transferpuffer (25mM Tris; 192mM Glyzin; 10% Methanol). Die getrockneten Membranen wurden zunächst mit 1xTBS für 30 min. geschüttelt und mit 5% Milchpulver in 1xTBS für 30 min. bei RT geblockt. Die Inkubation mit den spezifischen Primärantikörpern erfolgte ebenfalls in 5% Milchpulver in 1xTBS über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Nach fünfmaligem Waschen für jeweils 5 min. in 1xTBST erfolgte die Detektion der Primärantikörper durch speziesspezifische Meerrettich-Peroxidase gekoppelte anti-IgG Sekundärantikörper für 1h in 5% Milchpulver/1xTBS (1:10000 TrueBlot anti-Kaninchen IgG oder TrueBlot anti-Maus IgG; eBioscience). Die Detektion der

Antigen-Antikörperreaktionen erfolgte durch „Verstärkte Chemilumineszenz“ (SuperSignal Femto, Pierce).

4.8. Gel-Retentionsanalyse (EMSA)

Die Gel-Retentionsanalyse (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) beschreibt ein elektrophoretisches Untersuchungsverfahren, in dem die Interaktion zwischen DNA-bindenden Proteinen und einem DNA-Molekül mit einer für das betreffende Protein spezifischen Bindungsstelle analysiert wird. Protein-DNA-Komplexe wandern unter nicht-denaturierenden Bedingungen, bei der Verwendung von Puffern niedriger Ionenstärke, in die Gelmatrix eines nativen Polyacrylamidgels hinein und bleiben, ohne zu dissoziieren, während der Elektrophorese als Komplexe erhalten (Ibelgautz 1993). Das Prinzip der Retentionsanalyse beruht auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten von proteinfreien DNA Fragmenten und Protein-DNA-Komplexen. Durch radioaktive Markierung des DNA Fragments wird bei einer Komplex-Bildung das gebundene Protein durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

4.8.1. Radioaktive Markierung eines doppelsträngigen Oligonukleotids

Die komplementären Oligonukleotide wurden so synthetisiert, dass nach der Hybridisierung an den 5'-Enden jeweils zwei Guanine und zwei Cytosine überhängen. Im Rahmen der Arbeit wurden 3 Oligonukleotidpaare verwendet, von denen bekannt ist, dass sie an muskelspezifische MCAT-Motive binden (Farrance und Ordahl 1993; Abbildung 7).

```

bs01-fw: 5'-CCGGCGATCATTCCACATG- 3'
bs01-rev: 3' -GCTAGTAAGGTGTACGGCC-5'

bs02-fw: 5'-CCGGCGATCATTCCCACATG- 3'
bs02-rev: 3' -GCTAGTAAGGGGTACGGCC-5'

bs03-fw: 5'-CCGGCGATCATTCTCATG- 3'
bs03-rev: 3' -GCTAGTAAGGAGTACGGCC-5'

```

Abbildung 7. Die für den EMSA verwendeten 3 Oligonukleotidpaare beinhalten 3 verschiedene muskelspezifische MCAT- Bindemotive (rot) und jeweils am 5'-Ende Überhänge, die zur radioaktiven Markierung benötigt werden.

Im ersten Schritt erfolgt die Hybridisierung der Oligonukleotidpaare. Der Hybridisierungs-Ansatz wird 2 min. aufgekocht, 15 min. bei 65°C inkubiert, innerhalb von 40 min. auf RT abgekühlt und weitere 30 min. bei 37°C inkubiert:

1 µl	Oligonukleotid I [1µg/µl]
1 µl	Oligonukleotid II [1µg/µl] (Gegenstrang)

2 μ l	5x Hybridisierungspuffer
16 μ l	H ₂ O
20 μ l	Gesamtvolumen

Die radioaktive Markierung wird durch Auffüllen der 5'-überhängenden Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I in Gegenwart von radioaktivem α [³²P]-dCTP in folgendem Ansatz durchgeführt:

1 μ l	doppelsträngiges Oligonukleotid [100ng/ μ l]
2 μ l	Klenow-Puffer [10x]
2 μ l	dNTPs (ohne dCTP) [5mM]
1,5 μ l	α [³² P]-dCTP
12,5 μ l	H ₂ O
1 μ l	Klenow-Enzym [2U/ μ l]
20 μ l	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wird 20 min. bei RT inkubiert. Um homogene Enden zu erhalten, werden zusätzlich 2 μ l unmarkiertes dCTP [5mM] hinzu pipettiert und 5 weitere Minuten inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 μ l EDTA [0.5M] gestoppt und bei -20°C gelagert.

Zur Abtrennung der nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide und zur Reinigung des doppelsträngigen Oligonukleotide wird die Probe über eine Gelfiltrationssäule (ChromaSpin TE-100; Clontech) aufgereinigt und anschließend die Stärke der Markierung im Szintillationszähler (Beckmann) gemessen.

4.8.2. Gel-Retentionsanalyse

Die Reaktionsansätze werden auf Eis pipettiert und 5 min. präinkubiert:

25 μ l	EMSA-Bindepuffer
x μ l	<i>in vitro</i> translatierte(s) Protein(e)
x μ l	Kompetitor (poly dl/dc bzw. HS-DNA)

Nach Zugabe der radioaktiv markierten Oligonukleotide (70.000-100.000 cpm \ Ansatz) und weiterer 30 minütiger Inkubation auf Eis werden die Versuchsansätze über ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel (5%) aufgetrennt. Abschließend wird das Gel für 20 min. in 10% Essigsäure fixiert, getrocknet und über Nacht bei -80°C autoradiographisch exponiert.

Je nach der Art der zu untersuchenden DNA- Proteininteraktion wird die Konzentration der Ionen im Puffer während der Bindungsreaktion variiert. Einige Komplexe bleiben noch bei gesteigerten KCl Konzentration bestehen, wodurch eine hohe Bindungsspezifität nachgewiesen werden kann.

4.9. Sequenzierungsreaktion mit ABI PRISM™-System 310

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Kettenabbruchmethode, nach F. Sanger (Sanger *et al.* 1977), und dem ABI PRISM™-System 310 sequenziert. Diese Methode beruht im Wesentlichen darauf, dass die vier Didesoxynukleotide mit vier Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden und nach einem erfolgten Einbau einen Kettenabbruch bewirken. Die Auftrennung der DNA in den ABI PRISM™- System erfolgt durch Elektrophorese in einer 75µm dicken Kapillare. Ein 10mW Argonlaser, dessen Hauptemission bei Wellenlängen von 488 nm und 514,5 nm, regt die jeweiligen markierten Basen zur Aussendung von Fluoreszenzstrahlung an.

Markierung der DNA

- 4 µl Premix (DNA-Polymerase, Puffer, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs)
- 2 µl 5x BigDye Terminator Puffer
- 1 µg DNA
- 10 pmol Primer

Der Reaktionsansatz wird in einem Thermocycler mit folgendem Programm für insgesamt 25 Zyklen gefahren:

Denaturierung	96°C	30 sek.
Annealing	je nach Primer verschieden	30 sek.
Extension	60°C	4 min.

Probenaufbereitung

Die DNA wurde durch Zugabe von 5µl 125mM EDTA pH 8,0 und 75µl 100% unvergälltem Ethanol gefällt. Nach 15 minütiger Zentrifugation wurde das Pellet mit 70µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 12 µl TSR-Sequenz-Puffer aufgenommen und vor der anschließenden automatischen Sequenzierung für 2 min. denaturiert.

4.10. Zellkulturmethoden

4.10.1. Kultivierung der Zelllinien

Zellkulturen werden durch die Entnahme von Geweben und deren Dissoziation in Einzelzellen angelegt. Während dieses Prozesses werden die Zellen des Gewebes dispergiert und die *in vivo* existierenden Zellverbände aufgelöst. Eine solche Zellsuspension kann *in vitro* unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. So sind die in dieser Arbeit verwendeten Zellen nur nach der Adhäsion an ein geeignetes Substrat fähig, *in vitro* weiter zu wachsen. Sie haften am Gefäßboden und proliferieren, bis der Gefäßboden vollständig bedeckt ist. Als Zelllinien etablierte Zellen können über eine nahezu unbegrenzte Generationenzahl propagiert werden.

Drei Tage vor der Transfektion wurden die Zellen in 100mm Petrischalen mit einer Konzentration von 10^5 Zellen pro Schale in 10 ml Eagle-Medium (10% FKS) subkultiviert. Für die C₂C₁₂ Zellen wurde das Eagle-Medium mit 20% FKS benutzt. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen abgeerntet, ausgezählt und auf 30mm 6-Well-Platten in 3 ml Medium ausplattiert. Von den C₂C₁₂ und 10T1/2 Kulturen wurden 100.000 Zellen und von der Phoenix Kultur 150.000 Zellen pro Well verwendet. Am Tag der Versuchsdurchführung wurde frühestens drei bzw. spätestens eine Stunde vor der Transfektion ein erneuter Mediumwechsel durchgeführt.

4.10.2. Transfektion (Morgan und Darling 1994)

Die Transfektion ist die generelle Bezeichnung für ein Verfahren zur Einschleusung von DNA in eukaryontische Zellen (Ibelgautz 1993). Im Prinzip eignen sich alle verfügbaren Zellen von Mikroorganismen und Eukaryonten als Wirtszellen für die Aufnahme von Fremd-DNA. In dieser Arbeit wurden humane Zelllinien (HEK293) wie auch Maus-Zelllinien (Phoenix, C₂C₁₂, NIH 2T3 und 10T1/2) verwendet. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Kalziumphosphat-Präzipitation transfiziert. Diese beruht im Wesentlichen auf der Bildung eines DNA-Kalzium-Phosphat-Präzipitats, das direkt an den Zellen anhaftet und anschließend von der Zelle aufgenommen wird. Pro 30mm Well wurden 750µl 2xHBS-Puffer vorgelegt und mit der entsprechenden DNA Menge gemischt. Anschließend wurde tropfenweise 48µl 2M CaCl₂ zugegeben und der Reaktionsansatz dabei vorsichtig gemischt. Nach einer 20minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der gesamte Ansatz ebenfalls tropfenweise auf die Kulturschale pipettiert.

4.10.3. Cotransfektion

Bei der Regulation der Genexpression spielt die Regulation der Transkription die bedeutendste Rolle. Die wichtigsten Bestandteile sind dabei zum einen die Transkriptionsfaktoren und zum anderen die Erkennungssequenzen (*binding sites*) dieser Proteine auf der DNA. Transkriptionsfaktoren bestehen im Allgemeinen aus zwei verschiedenen Domänen: einem DNA-bindenden Teil und einem Aktivator- bzw. Repressor-Teil, der den aktivierenden oder reprimierenden Effekt auf den Transkriptionsapparat ausübt.

Die Analyse der Regulation der Genexpression zielt auf die Identifizierung wichtiger Kontrollelemente des zu untersuchenden regulierten Promotors ab sowie auf die Faktoren, die an den Strukturelementen dieses Promotors binden und trans-aktivierend bzw. trans-reprimierend auf das betreffende Gen wirken. Der Nachweis dieser Promotorelemente als auch der zellspezifisch benötigten Transkriptionsfaktoren kann mit Hilfe von DNA-Transfektionsexperimenten an Zellen in Kultur erfolgen. Bei diesen Untersuchungen werden Kontrollelemente (DNA-Bindungsstellen) synthetisiert und an ein Reporter-gen anstatt des ursprünglichen Gens gekoppelt. Anschließend in Zellen transfiziert, kann die Aktivität des Reporter-gens als die enzymatische Aktivität gemessen werden. Wenn ein Expressionskonstrukt, das vermutlich für ein Transkriptionsfaktor codiert, mit einem entsprechenden

Promotor-Reporter-Konstrukt in Zellen cotransfiziert wird, lässt sich die transkriptionelle Aktivität bzw. Repression des exprimierenden Proteins messen.

Die Cotransfektion wurde wie die oben beschriebene Transfektion durchgeführt. Dabei wurden von jedem eingesetzten Expressionskonstrukt (z.B. Transkriptionsfaktor(en), Promotor-Reporter-Konstrukt) 2 μg DNA pro Well einer 6-Well-Schale mit Hilfe der Kalziumphosphat-Präzipitation in die Zellen transfiziert. Zum Ausgleich der Gesamt-DNA-Menge wurde in den entsprechenden Reaktionsansätzen mit weniger Gesamt-DNA ein leerer *pKSI+* Vektor cotransfiziert.

4.10.4. Abernten und Lyse der Zellen

Das Medium wurde entfernt und die Zellen einmal mit 1x PBS Puffer gewaschen. Nach der Zugabe von 200 μl ZK-Lysispuffer wurden die Zellen aufgeschlossen. Durch Auf- und Abpipettieren bzw. mit Hilfe eines Zellkratzers wurden alle Zellbestandteile von der Platte abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt.

Die Zellsuspension wurde 2 min. bei 2.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Überstand befinden sich nun die von den Zellen produzierten Proteine (Proteinextrakt). Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Diese Methode eignet sich für die Lyse der Phoenixzellen. Für den Aufschluss der C₂C₁₂, NIH 3T3 und 10T1/2 Zellen wurde ein alternatives Protokoll benutzt: Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden einmal mit 1x PBS Puffer gewaschen. Nach der Zugabe von 200 μl 1x Trypsin/EDTA Lösung wurden die Zellen zum leichteren Ablösen von der Platte für 5 min. inkubiert, anschließend das Trypsin mit 800 μl Medium abgestoppt und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren von der Platte abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gehalten. Die Zellsuspension wurde 3 min. bei 2.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment mit 1x PBS gewaschen und schließlich in 100 μl 0.25M Tris/HCl pH7.5 resuspendiert. Die Zellsuspension kann bei -20°C gelagert werden.

Die Lysis der Zellen erfolgte mechanisch durch wiederholtes Einfrieren auf Trockeneis, Auftauen im 37°C Heizblock und anschließendem Vortexen. Abschließend wurden die lysierten Zellen für 5 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (Proteinextrakt) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und kann bei -20°C gelagert werden.

4.10.5. Messung und Nachweis der Enzymaktivität

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Reportergen im Vektor *pTA-Luc* codiert das Enzym Luciferase, welches Luciferin in der Gegenwart von ATP und Mg²⁺ zu Licht umsetzt. Die Lichtproduktion ist proportional zur Luciferasemenge, wodurch eine Quantifizierung des gebildeten Enzyms möglich wird (Gould und Subramani 1988). Die Vermessung der Lichtreaktion erfolgte im Mithras LB 940 Mikrotiterplatten-Lesegerät der Firma Berthold. Zum Abgleich der unterschiedlichen Transfektionseffizienz wurde während des Messvorgangs zuerst ein β -Galaktosidase „Assay“ durchgeführt und damit die anschließende Messung der Luciferase-Enzymaktivität abgeglichen.

4.10.5.1. β -Galaktosidase Reaktion

Die Zellen wurden zur Überprüfung der Transfektionseffizienz zusätzlich mit einem internen Standard cotransfiziert, der aus einem konstitutiv β -Galaktosidase exprimierenden Vektor (*pRSV- β -Gal*) besteht. Da sich das exprimierte Protein β -Galaktosidase im Cytosol befindet, kann es im Proteinextrakt der Zellen durch photometrische Messung nachgewiesen werden. Da die gemessene Menge an β -Galaktosidase proportional zur transfizierten DNA-Menge ist, können so die einzelnen Transfektionen untereinander abgeglichen werden. Zur größeren Genauigkeit dieser Abgleichmethode wurden vom *pRSV- β -Gal* Vektor nur 1/10 (= 0,2 μ g) der standardmäßig eingesetzten DNA-Menge transfiziert.

Das Volumen des Zellextraktes, welches für die Aktivitätsmessung der Luciferase eingesetzt wird, entspricht somit umgekehrt proportional der gemessenen β -Galaktosidase-Menge.

Da jedoch eine direkte Messung der β -Galaktosidase Konzentration im Proteinextrakt nicht möglich ist, wird stattdessen die Aktivität über die enzymatische Spaltung eines Substrates CPRG (Chlorphenolrot- β -D-Galaktopyranosid) bestimmt. Der Farbumschlag von gelb nach rot, wurde ebenfalls im Berthold Mithras LB 940 bei 620 nm quantitativ erfasst und entspricht der β -Galaktosidase Konzentration. Die Messung erfolgte nach folgendem Schema:

10 μ l der CPRG-Stammlösung [50mM] wurden mit 990 μ l Z-Puffer versetzt und gemischt. Jeweils 20 μ l des Proteinextraktes wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 80 μ l der CPRG-Lösung versetzt. Zusätzlich wurde parallel ein Kontrollansatz ohne Proteinextrakt vorbereitet. Danach wurde der Ansatz für 120 sek. bei 37°C inkubiert und für weitere 60 sek. geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Absorptionsmessung bei 620nm. Der gesamte Reaktionsansatz wurde danach für weitere 240 sek. bei 37°C inkubiert und für weitere 60 sek. geschüttelt und erneut die Absorption gemessen. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3x wiederholt und die Werte für den anschließenden Abgleich gemittelt.

4.10.5.2. Messung der Luciferase-Aktivität

Jeweils 50 μ l Proteinextrakt wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten vorgelegt und anschließend mit 100 μ l ATP-Lösung (10 μ l ATP-Stammlösung [500mM] + 990 μ l Luciferase-Mess-Puffer) versetzt. Im Berthold Mithras LB 940 wurden danach in jedes Well einzeln 50 μ l Luciferin-Lösung (10 μ l Luciferin-Stammlösung [25mM] + 990 μ l H₂O) injiziert und damit die Lichtreaktion gestartet. Nach 3 sek. Verzögerung wurde für 10 sek. die Lumineszenz gemessen. Zum Abgleich von Messungsschwankungen wurden jeweils 3 Messungen durchgeführt und gemittelt.

4.10.6. Wirkstoff-Screening mit Hilfe einer LOPAC Bibliothek

Eine LOPAC (*Library of Pharmacologically Active Compounds*) Bibliothek ist eine Sammlung von 1280 pharmakologisch aktiven Sigma-RBI Substanzen in einem 96-Well-Format. Jede Substanz liegt in einer Konzentration von 10mM in DMSO vor. Die Substanzen umfassen dabei Moleküle unterschiedlicher Wirkungsklassen aus verschiedenen biologisch relevanten Bereichen, wie z.B. der Signaltransduktion oder der Neurobiologie.

Mit Hilfe dieses Versuchs sollte die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Differenzierungsfähigkeit von C₂C₁₂ Myoblasten getestet werden, um mögliche Stoffe oder Stoffklassen zu identifizieren, die eine Differenzierung der Muskelvorläufer fördern oder hemmen. Darüber hinaus können auch Rückschlüsse auf die Art und Regulation der Prozesse während der Differenzierung gezogen werden. Grundlage für den Versuch ist die Beobachtung, dass C₂C₁₂ Zellen in einem Medium mit wenig fötalem Serum nach 4-5 Tagen zu Myotuben differenzieren. Durch die Zugabe der Substanzen bei „normalen“ Medium mit 20% FKS können somit differenzierungsfördernde Stoffe identifiziert werden, während bei Kulturen mit 2% Pferde-Serum eine mögliche Inhibierung durch Mitglieder der LOPAC Bibliothek untersucht werden kann.

Für das Experiment wurden je 1.500 C₂C₁₂ Zellen in DMEM (20% FKS) in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und nach 24h ein Mediumwechsel (DMEM, entweder mit 20%FKS [Proliferationsmedium] oder 2% Pferde-Serum [Differenzierungsmedium]) durchgeführt. Anschließend wurden je 1µl (50µM) bzw. 2µl (100µM) der LOPAC-Substanzen sowie DMSO als Blindprobe, direkt ins Medium pipettiert. Zur Überprüfung der Proliferation bzw. Differenzierung wurden jeweils C₂C₁₂ Kulturen ausschließlich in Proliferations- bzw. in Differenzierungsmedium inkubiert. Nach 6-7 Tagen wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit je 100µl ZK-Lysispuffer geerntet. Zur besseren Lyse der Zellen wurde zusätzlich 100µl destilliertes Wasser gegeben und bei RT für 15 min. geschüttelt. Das Zellysat kann anschließend bei -20°C gelagert werden.

4.10.6.1. Messung des Differenzierungsgrades

Die Messung des Differenzierungsgrades kann auf zweierlei Wegen durchgeführt werden. Zum einen kann durch eine optische Untersuchung nach morphologischen Veränderungen in den Kulturen und nach beginnender oder abgeschlossener Differenzierung zu Myotuben gesucht werden. Eine weitere Untersuchungsmöglichkeit ist die Messung der Muskel-Kreatin-Kinase Aktivität (engl. MCK). Die MCK wird fast ausschließlich im differenzierten Skelettmuskel und nur in geringen Mengen im Herzen und im Hirn exprimiert und gilt somit als sicherer Marker für eine Muskel-Differenzierung (Faulker und Meites 1982). Normalerweise dient die MCK Aktivitätsmessung der Diagnose von Muskeldystrophie und anderer Skelettmuskelerkrankungen, der Identifizierung von Herzinfarkten und -hypertrophien sowie einer Reihe von anderen Erkrankungen (Rosalki 1967).

Die Messung der MCK Aktivität erfolgte mit einem Kit der Firma BioQuant, der im Wesentlichen auf der reversiblen Reaktion zwischen Kreatin-Phosphat und ADP beruht. MCK katalysiert diese Reaktion, wobei Kreatin und ATP gebildet wird. Durch eine im Reaktionsansatz vorhandene Hexokinase wird der Phosphatrest des ATPs auf Glukose übertragen. Das gebildete Glukose-6-Phosphat wird durch eine Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase oxidiert und NAD dabei zu NADH reduziert. Diese Redoxreaktion kann dann bei 340nm gemessen und ist proportional zur MCK-Aktivität.

Die Messung erfolgte im Berthold Mithras LB 940 mit einem 355nm UV-Filter in 96-Well-Mikrotiterplatten, wobei je 100µl Zellysat vorgelegt und danach für 180 sek. bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden je 100µl des ebenfalls bei 37°C vorgewärmten MCK-Reaktionspuffers injiziert. Nach jeweils 60 sek. schütteln wurde der Reaktionsansatz 5x vermessen. Zur Ermittlung der MCK-Aktivität wurde die durchschnittliche Änderung der Absorption pro Minute berechnet und mit dem Faktor 6592 (errechnet aus Reaktionsvolumen, Lichtweg und millimolaren Absorptionsvermögen von NADH) multipliziert. Der errechnete Wert ergibt die Aktivität der Muskel-Kreatin-Kinase in IU/l (*international units* pro Liter) an.

5. Ergebnisse

5.1. Gezielte Veränderung des *Pax7* Genlocus

Bereits 1996 konnten Mansouri und Mitarbeiter mit Hilfe eines konstitutiven *LacZ Knock In* im *Pax7* Genlocus die Notwendigkeit dieses Gens für eine korrekte embryonale und juvenile Entwicklung zeigen. Die neugeborenen homozygoten Mäuse waren zwar lebensfähig, starben jedoch zu 97% innerhalb der ersten 3 Wochen nach der Geburt. Die Mäuse zeigten zudem auffällige Veränderungen im Bereich der Nase und der Kiefer, welche von den Autoren auf das Fehlen von *Pax7* im Bereich der Neuralleiste zurückzuführen sind. Im zentralen Nervensystem sowie in der Skelettmuskulatur, in denen *Pax7* normalerweise exprimiert wird, fanden sich jedoch keine auffälligen Veränderungen. Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass *Pax3* - welches ein redundantes Expressionsmuster zeigt - das Fehlen von *Pax7* kompensieren kann. Weitere Untersuchungen zeigten zudem eine Expression von *Pax7* in den Satellitenzellen und es konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Anzahl der Satellitenzellen in den *Pax7^{-/-}* Mäusen im Verlauf der weiteren Entwicklung stetig abnimmt, weshalb die spätere Regeneration der Skelettmuskeln beeinträchtigt ist. Aufgrund dieser Beobachtungen und der Tatsache, dass die homozygoten *Pax7^{-/-}* Mäuse nur schwer Untersuchungen in adulten Stadien zulassen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein konditionell induzierbarer *Knock Out* des *Pax7* Locus kloniert werden und damit eine stabile Mauslinie etabliert werden. Weiterhin erlaubt eine induzierbarer *Knock Out* die Untersuchung epistatischer Regulationsbeziehungen, wenn zur Deletion Promotoren eingesetzt werden, die entweder *up-* oder *downstream* des zu deletierenden Zielgens wirken.

5.1.1. Die Konstruktion des „Gene-Targeting“ Vektor

Für eine gezielte Veränderung des *Pax7* Locus wurde zunächst ein „Targeting“-Vektor konstruiert, der linearisiert in embryonale Stammzellen elektroporiert wird und anschließend aufgrund eingefügter homologer genomischer Abschnitte ins Genom integriert wird und schließlich das Wildtyp-Allel ersetzt. Mit dem „Targeting“-Vektor für *Pax7* sollten zwei loxP-Elemente, links und rechts der „paired box“ kodierenden Exone Nummer I bis III, zusammen mit einem FRT-flankierten synthetischen Gen für die Neomycinphosphotransferase in das Intron 3 des *Pax7* Gens eingefügt werden (Abbildung 8A). Die Neomycinphosphotransferase verleiht seiner Wirtszelle Resistenz gegen das Antibiotikum G418 und erlaubt eine pharmakologische Selektion der Zellen, die den „Targeting“-Vektor in ihr Genom integriert haben. Die Flankierung von Gensegmenten mit loxP-Elementen ermöglicht die Deletion von DNA-Sequenzen durch Cre-vermittelte Rekombination (Sternberg *et al.* 1986; Sauer 1992). Ausgangspunkt für die Herstellung des „Targeting“-Vektors war ein genomischer λ -Klon, der aus einer genomischen Balb/c Bibliothek isoliert und anschließend in den Vektor *pBluescript* kloniert wurde (*pBluescript* λ Pax7). Der Klon enthielt eine 18,4 kbp lange genomische DNA-Sequenz, welche den 5'

untranslatierten Bereich (12,6 kbp), die kodierenden Exone Nummer I bis IV - mit den entsprechenden Intronen 1 bis 3 - sowie ca. 1,5 kbp des Introns 4 umfasste (Abbildung 8B).

Durch einen NotI/XhoI Restriktionsverdau wurde ein 16,3 kbp Fragment aus dem λ -Klon isoliert und in einen modifizierten *pBluescriptII* Vektor (*pKSG-3*) kloniert. Mit Hilfe einer zusätzlichen SacII Schnittstelle, flankierend zum 5'-Ende des Fragments sowie einer internen SacII Erkennungssequenz wurde wiederum ein 14,1 kbp großer DNA-Abschnitt isoliert (=langer Arm). Dieses Fragment wurde anschließend in die SacII Schnittstelle eines modifizierten *puc18* Klonierungsvektors (*pucSG-3*) fusioniert. Dieser zusätzliche Schritt wurde durchgeführt um die Voraussetzungen für die Einführung der ersten loxP Erkennungsstelle zu schaffen. Hierzu war ein BsaAI-Restriktionsverdau im langen Arm notwendig. Jedoch befindet sich eine weitere Schnittstelle auch in der Rückrad-Sequenz von *pBluescript*, im Bereich des „f1-Origins“, weshalb dieser Vektor für diesen Schritt ungeeignet war und in den *pucSG-3* umkloniert werden musste. Für die Einführung der loxP Erkennungstelle wurden zwei komplementäre Primer entworfen, die sowohl die eigentliche loxP Sequenz und eine zusätzliche NdeI Schnittstelle, zur späteren Überprüfung der Rekombination, enthielten. Die Primer wurden durch einmaliges Kochen und anschließendes langsames Abkühlen aneinandergelagert und in die BsaAI Schnittstelle des langen Arms kloniert. Da diese Klonierung ungerichtet ist, wurde die Sequenz der Primer so gewählt, dass bei richtiger Orientierung der loxP Sequenz die benachbarte AfIII Schnittstelle zerstört wird, bei falscher Orientierung jedoch erhalten bleibt. Abschließend wurde der 14,1 kbp lange Arm mit loxP in die SacII Schnittstelle des *pKOII DTA* Vektors fusioniert (*pKOII DTA long arm*).

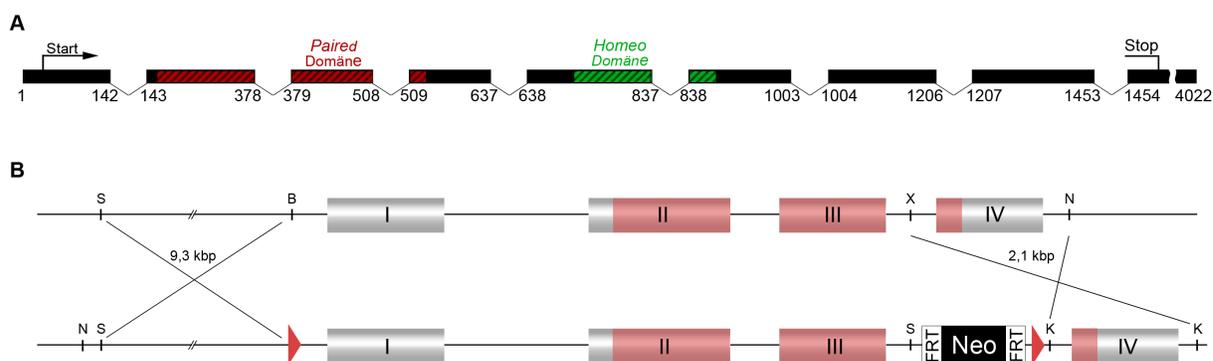


Abbildung 8. Schematische Darstellung des Pax7 Genabschnittes im Mausgenom und des daraus abgeleiteten „Targeting“-Vektors. **A:** Die genomische Struktur des Pax7 besteht aus 9 Exonen mit 8 dazwischen gelegenen Intronen. Die Genabschnitte wurden in 5' nach 3' Orientierung angegeben, der Start und das Ende des offenen Leserahmens sowie die für die Funktion entscheidenden Abschnitte (Paired- und Homeo-Domäne) eingezeichnet. Die Zahlen bezeichnen die Position der Base in der cDNA-Sequenz. **B:** Der „Targeting“-Vektor (unten) enthält neben den Exonen I bis IV, ein FRT flankiertes Neomycinphosphotransferase-Gen (Neo) im Intron 3 sowie zwei loxP Erkennungstellen (rote Dreiecke). Die Rekombination mit der genomischen Wildtyp-DNA (oben) erfolgt über zwei homologe Bereiche mit 9,3 kbp bzw. 2,1 kbp Länge. Die für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen wurden eingezeichnet (S, SacII; B, BsaAI; N, NotI; X, XhoI und K, KpnI). Durch Cre-vermittelte Rekombination können später die Exone I bis III, und damit nahezu die komplette Paired-Domäne, deletiert werden (rote Abschnitte). Ein Entfernen der Neomycin-Selektions-Kassette ist durch eine Flp-Rekombinase-vermittelte Rekombination möglich.

Für den kurzen Arm wurde aus dem λ -Klon mittels NotI/XhoI Verdau das 2,1 kbp Fragment isoliert und in einen modifizierten *pBluescript* Vektor (*pKSG-5*) kloniert. Damit eine spätere Linearisierung des fertigen „Targeting Vektors“ am langen Arm möglich ist, muss die an dem kurzen Arm befindliche NotI Schnittstelle zerstört werden. Dazu wurde der Vektor mit NotI/KpnI geöffnet und ein passendes kurzes DNA Fragment aus aneinander gelagerten Primern in die Schnittstelle eingefügt. Die überhängenden Enden wurden dabei so gewählt, dass durch die Fusion eine funktionelle KpnI Schnittstelle entstand, die NotI Erkennungssequenz jedoch zerstört wurde. Im nächsten Schritt wurde das 2,1 kbp Fragment mit Hilfe von zwei flankierenden KpnI Schnittstellen aus dem *pKSK-5* ausgeschnitten und in die KpnI Schnittstelle des *pK0II DTA long arm* kloniert. Der fertige „Targeting“-Vektor (Abbildung 8B) umfasste somit eine Neomycin-FRT-Kassette, flankiert von einem 14,1 kbp langen 5'-Arm sowie einen kurzen Arm von 2,1 kbp, der die Analyse homologer Rekombinationsereignisse mittels Southern Hybridisierung ermöglichte. Um eine Unterscheidung von Wildtyp und modifiziertem *Pax7* Gen auch auf RNA-Ebene zu ermöglichen, wurden mit dem *pK0II-DTA* Rekombinationsvektor noch zusätzliche BglII, KpnI, NdeI und SacII Restriktionsstellen eingeführt.

Nach Sequenzanalyse des fertig gestellten „Targeting-Vektors“ wurde das Konstrukt an der 5' gelegenen NotI Schnittstelle linearisiert, aufgereinigt und anschließend in embryonale Stammzellen elektroporiert.

5.1.2. Homologe Rekombination des „Targeting-Vektors“ in ES-Zellen

Je 1×10^7 embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der männlichen Linie ES-MK-V8.1 wurden mit $25 \mu\text{g}$ NotI linearisiertem „Targeting“-Plasmid elektroporiert und je 2×10^6 ES-Zellen auf Feederzell-Platten (\varnothing 10cm) ausgesät. Nach 9-10 Tagen Selektion in G418 enthaltendem ES-Zellkulturmedium wurden resistente ES-Zellkolonien isoliert. Durch eine Southern-Blot-Hybridisierung mit einer Sonde, die außerhalb des „Targeting“-Vektors bindet (Abbildung 9A), wurden jene Klone identifiziert, die den veränderten genomischen DNA-Abschnitt durch homologe Rekombination aufgenommen hatten. Dazu wurde die genomische DNA der ES-Klone nach Verdau mit dem Restriktionsenzym BglII auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Als radioaktive Sonde wurde ein 614 bp langes DNA-Fragment verwendet (*Sonde 3.4*), welches mit Hilfe einer PCR amplifiziert wurde und auf einem Sequenzbereich 3' außerhalb des „Targeting“-Vektors hybridisiert. Alternativ zur 3' gelegenen Sonde, konnte auch eine weitere 678 bp lange Sonde (*Sonde 5.1*) verwendet werden, die außerhalb des Vektors im 5' untranslatierten Bereich des *Pax7* Gens liegt. Für diese Hybridisierung wurde die DNA mit NdeI verdaut und geblottet. Die unterschiedlichen Fragmentgrößen zwischen Wildtyp und Mutante entstehen durch eine NdeI Schnittstelle, die zusammen mit dem loxP Element in die BsaAI Schnittstelle eingeführt wurde.

Die unterschiedlichen DNA-Fragmentgrößen des *Pax7* Wildtyps und des *Pax7^{loxP/Neo}* Allels, detektiert durch Sonde 3.4, bestätigten die homologen Rekombinationsereignisse. Im Wildtyp-Allel des *Pax7* Gens wird ein Fragment von 4,8 kbp hybridisiert, während nach erfolgreicher homologer

Rekombination ein DNA-Fragment von 2,8 kbp detektiert wird (Abbildung 9B). Um nachzuweisen, dass die Rekombination im 5' Bereich des „Targeting“-Vektors auch wie gewünscht vor der eingeführten einzelnen loxP Erkennungstelle erfolgt ist (siehe Abbildung 8B), wurde mit den potentiell positiven Klonen eine zusätzliche PCR-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die Primer Pax7 wt fw und Pax7 wt rev verwendet, die eine Amplifikation über die BsaAI Schnittstelle im langen homologen Arm erlauben (Abbildung 9A). Sollte wie im Wildtyp an der Restriktionsschnittstelle keine loxP Sequenz vorhanden sein, wird ein 264 bp Fragment amplifiziert. Beim Vorhandensein der loxP Erkennungstelle wird das PCR-Produkt um die 48 Basen der eingeführten loxP Sequenz vergrößert und somit ein 312 bp großes Fragment amplifiziert (Abbildung 9C). Aus insgesamt 1536 (4x 384) isolierten ES-Kolonien wurden insgesamt 16 ES-Klone mittels Southern-Hybridisierung als positiv identifiziert und zur weiteren PCR-Analyse verwendet. Dabei konnte bei den drei ES-Klonen K2-32, K2-272 und K4-54 ein korrektes Rekombinationsereignis nachgewiesen werden. Alle drei ES-Klone wurden für die Blastozysten-Injektion vorbereitet.

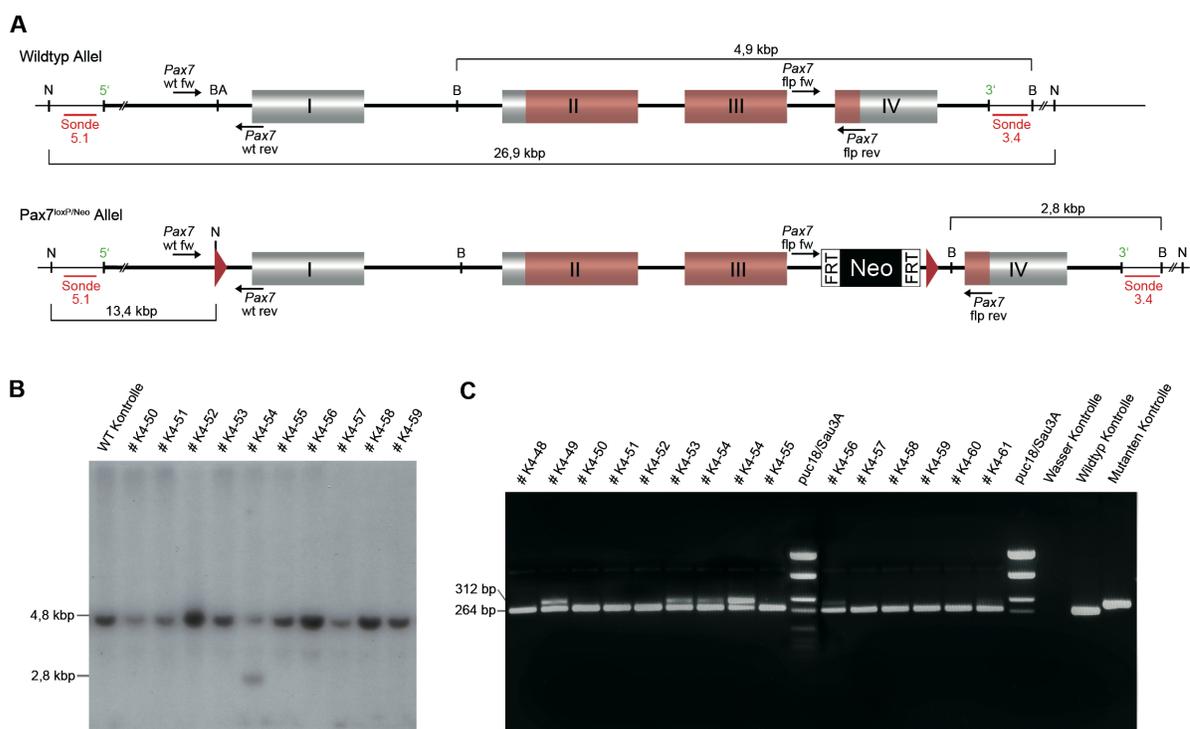


Abbildung 9. Strategie zur Identifizierung homologer Rekombinationsereignisse im Pax7 Gen. **A:** Schematische Darstellung des Wildtyp- und Pax7^{loxP/Neo} Allels nach homologer Rekombination. Die Positionen der Hybridisierungssonden 5.1 und 3.4 wurden mit roten Balken markiert und die kodierenden Exone I bis IV mit der Paired-Domäne (rot abgesetzt) eingezeichnet. Die zusätzlich in den „Targeting“-Vektor eingeführten loxP-Elemente wurden mit roten Dreiecken sowie das synthetische Neomycinphosphotransferase-Gen mit NEO/FRT markiert. Für die Southern-Blot-Analyse relevante Restriktionsschnittstellen wurden eingezeichnet (N, NdeI; BA, BsaAI und B, BglII); und das 5'- bzw. 3'-Ende des „Targeting“-Vektors mit grünen Ziffern gekennzeichnet. Die Oligonukleotide für die PCR wurden als schwarze Pfeile eingefügt (Pax7 wt fw; Pax7 wt rev; Pax7 flp fw; Pax7 flp rev). **B:** Southern Blot Analyse von ES-Klonen nach BglII-Verdau und Detektion mit der Sonde 3.4. Die DNA-Fragmentgrößen wurden in Kilobasenpaaren (kbp) angegeben. **C:** Agarosegele der PCR Analyse von ES-Klonen mit den Oligonukleotiden Pax7 wt fw und Pax7 wt rev. Als Größenmarker wurde mit Sau3A geschnittene puc18 DNA verwendet. Die Größe der Fragmente ist in Basenpaaren (bp)

angegeben.

5.1.3. Die Etablierung von stabilen Mauslinien mit verändertem *Pax7* Allel

Die positiven *Pax7*^{-loxP/Neo} ES-Zell-Klone K2-32, K2-272 und K4-54 wurden für die Injektion in C57Bl/6 Mausblastozysten eingesetzt. Trotz mehrfacher Injektionen konnten jedoch nur für den Klon K2-272 drei Chimären und für Klon K4-54 zwei Chimären erhalten werden. Nur die hochchimären Nachkommen aus der Injektion des Klones K4-54 gaben das manipulierte *Pax7* Allel in der Keimbahn weiter und wurden deshalb auch als Gründertiere bezeichnet. Diese Tiere dienten im weiteren Verlauf als Grundlage zur Etablierung der stabilen Mauslinien *Pax7cKO*^{Neo}, *Pax7cKO* und *Pax7KO*.

5.1.3.1. Die *Pax7cKO*^{Neo} Mauslinie enthält die geflochtenen Exone I bis III und die FRT-flankierte Neomycin-Kassette

Zum Aufbau der *Pax7cKO*^{Neo} Mauslinie wurden die hochchimären Gründertiere mit C57Bl/6 Mäusen zurückgekreuzt, die Nachkommen mit heterozygotem *Pax7*^{-loxP/Neo} Allel selektiert und untereinander verpaart. Die Überprüfung der Genotypen der Nachkommen erfolgte durch PCR sowie Southern-Blot-Analyse gemäß den Strategien für die homologe Rekombination in ES-Zellen (Abbildung 9A).

Es konnten zunächst für 3 Nachkommen (2 Männchen [#13656, #13657]; 1 Weibchen [#14862]) die korrekten Rekombinationsereignisse durch PCR-Analyse (Abbildung 10A) und Southern-Blot nachgewiesen werden (Abbildung 10B). Die nachweislich heterozygoten Tiere wurden wiederum untereinander verpaart und die homozygoten Tiere per PCR-Analyse (Abbildung 10C) und Southern-Blot-Analyse (Abbildung 10D) identifiziert. Zunächst konnten insgesamt 2 Weibchen erhalten werden (#16749 und #16750; Abbildung 10C und D), welche die Ursprungstiere für die *Pax7cKO*^{Neo} Mauslinie

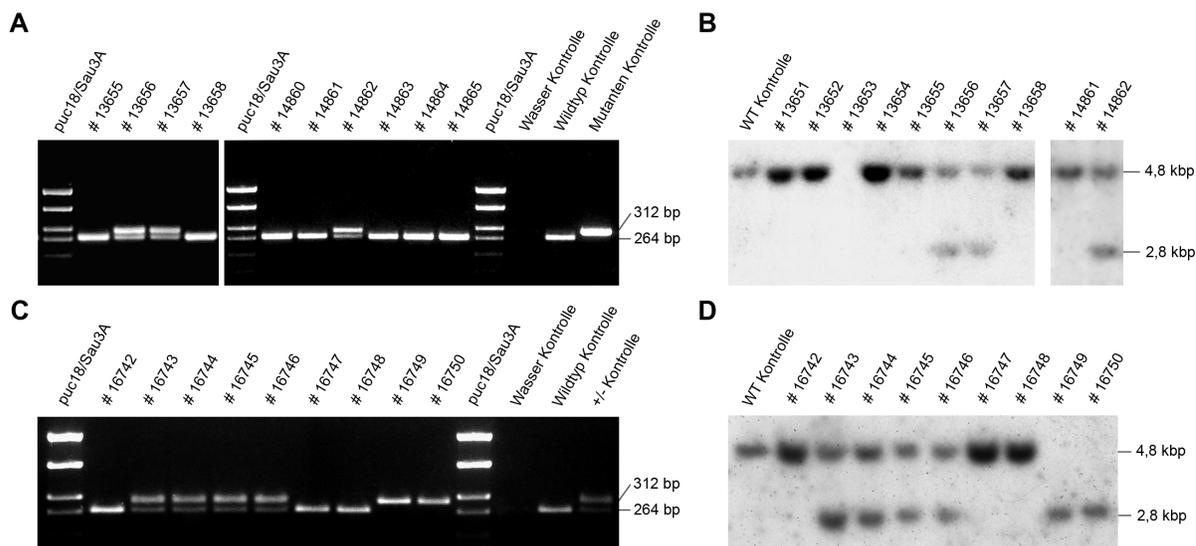


Abbildung 10. Genotypisierung der Nachkommen der $Pax7^{loxP/Neo}$ Chimäre nach Rückkreuzung mit C57Bl/6 durch PCR (**A** und **C**) sowie Southern-Blot-Analyse (**B** und **D**) und Etablierung der Mauslinie $Pax7cKO^{Neo}$. Die PCR Genotypisierung erfolgte mit den Primern $Pax7^{wt\ fw}$ und $Pax7^{wt\ rev}$, wobei eine Mutantenbande von 312 bp und eine Wildtyp-Bande von 264 bp entstand. Der Southern Blot erfolgte nach Restriktionsverdau mit BglII und wurde mit der Sonde 3.4 hybridisiert. Die Größe des detektierten Wildtyp-Fragments beträgt dabei 4,8 kbp, während das hybridisierte Fragment des $Pax7^{loxP/Neo}$ Allels ca. 2 kbp kleiner ist.

bilden sollten. Jedoch zeigten beide Tiere deutliche Beeinträchtigungen in der postnatalen Entwicklung, weshalb eine der beiden homozygoten Nachkommen bereits nach 26 Tagen starb (siehe auch 5.2.1. und Abbildung 13A). Da vom konstitutiven $Pax7^{LacZ}$ Knock In bekannt ist, dass 97% der homozygoten $Pax7^{LacZ}$ Mäuse innerhalb der ersten 3 Wochen nach der Geburt sterben, wurde das zweite Weibchen 48 Tage nach der Geburt zur Untersuchung der Veränderungen in der $Pax7$ Expression bzw. Translation präpariert und verschiedene Muskeln und Organe zur RNA- sowie Proteinisolation isoliert (siehe auch 5.2.1.).

Da dieser Phänotyp auch in weiteren Würfen dieser Linie auftrat, wurde die $Pax7cKO^{Neo}$ Linie ausschließlich heterozygot gehalten und nur für definierte Versuchszwecke eine homozygote Zucht durchgeführt. Die standardisierte Genotypisierung der Mauslinie erfolgte dabei durch PCR (siehe Abbildung 10).

5.1.3.2. Die Etablierung der $Pax7cKO$ Linie durch Deletion der Neomycin-Kassette mit Hilfe der Flp-Rekombinase

Zeitgleich zur Verkreuzung der heterozygoten $Pax7^{loxP/Neo}$ Tiere untereinander, wurden auch Verpaarungen mit Flp-Deleter-Mäusen durchgeführt, um die $Pax7cKO$ Mauslinie zu erzeugen, welche zwar die geflochten $Pax7$ -Allele besitzt, die Neomycin-FRT-Selektionskassette jedoch bereits wieder deletiert wurde. Um einen möglichst gleichmäßigen genetischen Hintergrund zu behalten, wurde hierzu ausschließlich das Männchen #13657 (siehe Abbildung 10) mit Flp-Deleter Weibchen verpaart.

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte sowohl durch PCR als auch durch Southern Hybridisierung. Für die PCR Genotypisierung wurden die Primer $Pax7^{flp\ fw}$ und $Pax7^{flp\ rev}$ verwendet, die auf dem Wildtyp-Allel zur Amplifikation eines 90 bp Fragments führen. Ist die FRT-Neomycin-Kassette noch im Allel enthalten, wird kein Produkt amplifiziert. Nach Entfernung der Neo-Kassette durch Flp-Rekombinase ist das erhaltene PCR-Produkt, aufgrund der weiterhin vorhandenen loxP Sequenz und zusätzlicher, durch die Herstellung des „Targeting“-Vektors bedingter „Rest-Sequenzen“, ca. 280 bp groß (Abbildung 11A). Die Richtigkeit der PCR wurde durch einen Southern Blot bestätigt, wofür die genomische Mausschwanz-DNA sowohl mit BglII und SacII verdaut wurde. Die Hybridisierung erfolgte in beiden Fällen mit der Sonde 3.4. Die Genotypisierung mit BglII entspricht der Standard-Genotypisierung (siehe Abbildung 9), während der Verdau mit SacII zur Detektion eines ca. 20 kbp Fragments in der Wildtyp-Situation führt. Nach korrekter Rekombination des „Targeting“-Vektors in den $Pax7$ Locus, sollte ein verkürztes Fragment von 8,8 kbp entstehen, dass nach Deletion der Neomycin-Kassette um weitere 2 kbp auf 6,8 kbp Länge reduziert wird (Abbildung 11B).

Aus der ersten Verpaarung ging zunächst nur ein Männchen hervor (#17357; siehe Abbildung 11A und B), welches mit ebenfalls heterozygoten Weibchen aus nachfolgenden Verkreuzungen verpaart wurde. Der erste homozygote Nachkomme (#143; siehe Abbildung 11C und D) wurde zunächst mit heterozygoten Partnern verpaart um weitere homozygote Tiere zu erhalten. Zur Erhaltung und Verbreiterung der Linie wurden nachfolgend ausschließlich homozygote Mäuse verpaart. Die standardisierte Genotypisierung erfolgte dabei durch PCR (siehe Abbildung 11).

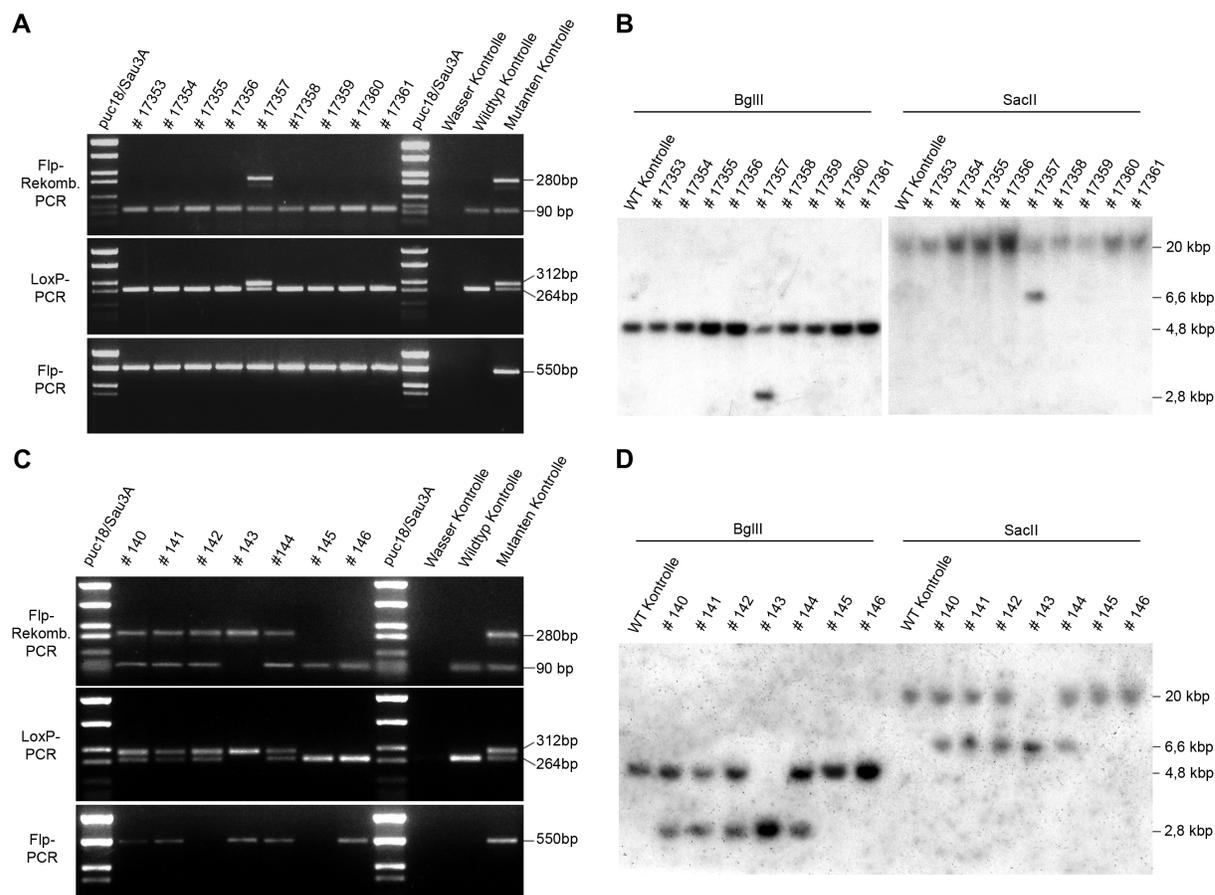


Abbildung 11. Genotypisierung der Pax7cKO Mauslinie durch PCR (A, C) und Southern Blot (B, D). Die PCR Genotypisierung erfolgte mit den Primerpaaren Pax7 flp fw/rev (A und C, oben), Pax7 wt fw/rev (A und C, Mitte) sowie Flp fw/rev (A und C, unten). Die Größe der entstandenen Mutanten- bzw. Wildtyp-Banden sind jeweils eingezeichnet. Der Southern Blot erfolgte nach Restriktionsverdau mit BglIII (rechts) und SacII (links) und wurde jeweils mit der Sonde 3.4 hybridisiert. Die Größe des detektierten Wildtyp-Fragments beträgt nach BglIII Verdau 4,8 kbp und nach SacII Verdau 20 kbp. Das hybridisierte Fragment des Pax7^{loxP} Allels ist dagegen nach BglIII Verdau 2,8 kbp und nach SacII Verdau 6,6 kbp groß.

5.1.3.3. Funktionelle Ausschaltung von Pax7 durch Cre-vermittelte Rekombination in der Pax7KO Mauslinie

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem konditionellen Pax7^{loxP} Allel auch um ein funktionelles Knock Out Konstrukt handelt, wurde durch Einkreuzung von Cre-Deleter Mäusen die Pax7KO Linie etabliert. Durch die konstitutiv exprimierte Cre-Rekombinase sollten im Pax7^{loxP} Allel die Exone I bis III deletiert werden. Die somit erzeugte Pax7-Nullmutation sollte im Phänotyp der konstitutiven Pax7 Knock out

Maus entsprechen, in welcher durch die Insertion einer β -Galactosidase- und PGK-Neo-Kassette ins Exon II die Funktionalität des Gens ausgeschaltet ist (Mansouri et al. 1996b). Die neugeborenen Mäuse dieser Linie zeigen Veränderungen in den cranio-fascialen Strukturen und sterben zu 97% innerhalb der ersten 3 Wochen nach der Geburt. Die *Knock out* Mäuse, welche überleben, zeigen in der postnatalen Entwicklung deutliche Wachstumsdefizite und haben eine reduzierte Anzahl an Satellitenzellen, die sich bis zum Tod der Tiere weiter reduziert.

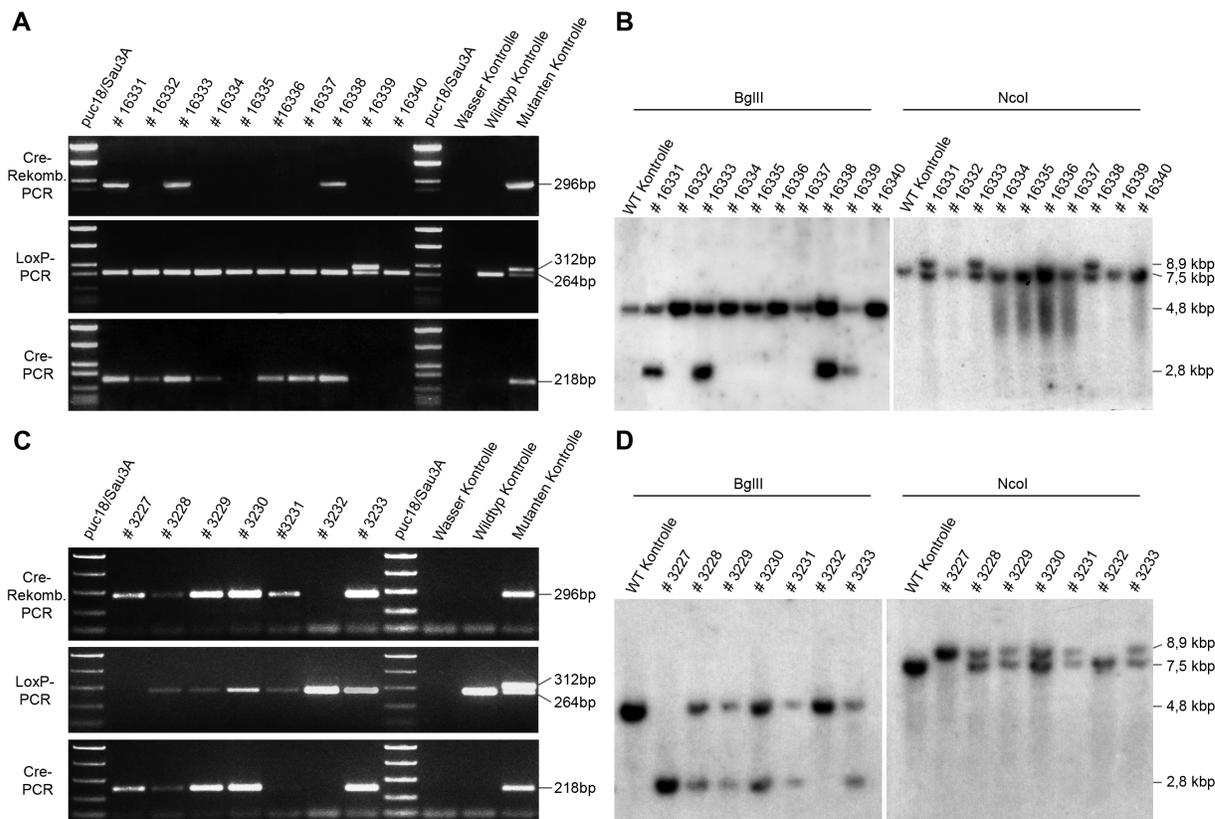


Abbildung 12. Strategie zur Cre-Rekombinase-vermittelten Inaktivierung des Pax7 Gens. Die Genotypisierung der Pax7KO Mauslinie erfolgte durch PCR (**A, C**) und Southern Blot (**B, D**). Für die PCR wurden die Primerpaare Pax7 wt fw und Pax7 flp rev (A und C, oben), Pax7 wt fw/rev (A und C, Mitte) sowie Cre fw/rev (A und C, unten) verwendet. Die Größe der amplifizierten Mutanten- bzw. Wildtyp-Fragmente sind jeweils angegeben. Der Southern Blot erfolgte nach Restriktionsverdau mit BglIII (rechts) und NcoI (links) und wurde jeweils mit der Sonde 3.4 hybridisiert. Die Größe des detektierten Wildtyp-Fragments beträgt nach BglIII Verdau 4,8 kbp und nach NcoI Verdau 7,5 kbp. Das hybridisierte Fragment des Pax7^{loxP/Neo} Allels ist nach NcoI Verdau - aufgrund interner Schnittstellen - weiterhin 7,5 kbp groß. Dagegen wird nach BglIII Verdau ein 2,8 kbp Fragment detektiert. Nach korrekter Deletion der Exone I bis III im Pax7^{delta} Allel hybridisiert die Sonde nach BglIII Verdau weiterhin ein 2,8 kbp Fragment, während nach Verdau mit NcoI eine Hybridisierung bei 8,9 kbp erfolgt.

Zur Etablierung der Pax7KO Linie wurde wiederum das chimäre Männchen #13657 (siehe Abbildung 10) verwendet und mit Cre-Deleter Weibchen verpaart. Unter den Nachkommen des 1. Wurfs waren 2 Männchen [#16331 und #16333] und ein Weibchen [#16338], die eine Deletion der ersten drei Exone aufwiesen (Abbildung 12). Die Genotypisierung erfolgte zunächst durch PCR und Southern Blot. Für die PCR wurden drei verschiedene Primerkombinationen verwendet. Eine Cre-spezifische PCR mit den Primern Cre fw und Cre rev diente dem Nachweis des transgenen Cre-Deleter Allels (Abbildung

12A und C, unten), während die beiden anderen PCRs Aufschluss über die korrekte Deletion der Exone I bis III geben sollten. Die Primerkombination *Pax7 wt fw* und *Pax7 wt rev* führt beim Vorhandensein eines Wildtyp-Allels zur Amplifikation eines 264 bp Fragments bzw. zur Bildung eines 312 bp Produkts beim *Pax7^{loxP/Neo}* Allel. Sind die Exone I bis III durch die Cre-Rekombinase deletiert, wird kein Produkt amplifiziert (siehe Abbildung 9; Abbildung 12A und C, Mitte). Als zusätzlicher Nachweis wurde eine PCR mit den Primern *Pax7 wt fw* und *Pax7 flp rev* durchgeführt, die nach korrekter Cre-Rekombination zur Amplifikation eines 296 bp Fragments führt (siehe Abbildung 9; Abbildung 12A und C, oben). Die Genotypisierung durch den Southern Blot erfolgte nach Verdau mit BglIII und NcoI und Hybridisierung durch die Sonde 3.4. Dabei beträgt die Größe der detektierten Wildtyp-Fragmente nach BglIII Verdau 4,8 kbp und nach NcoI Verdau 7,5 kbp. Aufgrund von NcoI Schnittstellen innerhalb der Neomycin-Kassette, ist das hybridisierte Fragment des *Pax7^{loxP/Neo}* Allels nach NcoI Verdau weiterhin 7,5 kbp groß, wogegen nach BglIII Verdau ein 2,8 kbp Fragment detektiert wird. Erfolgt eine korrekte Deletion der Exone I bis III wobei das *Pax7^{delta}* Allel entsteht, hybridisiert die Sonde 3.4 nach BglIII Verdau weiterhin ein 2,8 kbp Fragment, während nach Verdau mit NcoI eine Hybridisierung bei 8,9 kbp erfolgt.

Die heterozygoten Tiere wurden untereinander verpaart um homozygote *Pax7^{delta}* Mäuse zu erhalten. Nachdem im ersten Wurf bereits ein Jungtier noch vor der Genotypisierung (21 Tage nach Wurf) verstarb, konnte im zweiten Wurf ein Weibchen mit homozygoten *Pax7^{delta}* Allel [#3227] identifiziert werden (Abbildung 12C und D). 40 Tage nach der Geburt wurde die Maus zur Untersuchung und Vergleich des Phänotyps präpariert und verschiedene Organe zur Analyse der mRNA- und Proteinlevel entnommen (siehe 5.2.2. und 5.2.3.). Nach weiteren Verpaarungen zeigte sich, analog zum konstitutiven *Pax7^{LacZ} Knock In*, dass die homozygoten Nachkommen der *Pax7KO* Linie fast ausschließlich innerhalb des ersten Lebensmonats aufgrund postnataler Entwicklungsstörungen starben. Für eine gesicherte statistische Auswertung des letalen Phänotyps waren jedoch zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht genügend Tiere vorhanden. Bedingt durch den frühzeitigen Tod der Tiere, wurde die *Pax7KO* Linie ausschließlich heterozygot gehalten und nur für definierte Experimente gezielt homozygote Nachkommen erzeugt. Die Genotypisierung erfolgte dabei durch PCR.

5.2. Analyse des Phänotyps konditionell deletierter *Pax7*-Mäuse

Als erste grundlegende Untersuchung der generierten *Pax7* Mauslinien sollte eine Analyse der exprimierten mRNA Mengen sowie die daraus resultierenden Proteinlevel durchgeführt werden. Hierzu wurden jeweils gleichgeschlechtliche Geschwistertiere verwendet, die einen Wildtypen und ein heterozygoten sowie homozygoten Tier der Linie umfassten. Nach zervikaler Dislokation wurden den Tieren verschiedene Organe zur Protein- und RNA-Isolation entnommen sowie eine Myotuben-Präparation aus dem *Musculus flexor*, mit anschließender CD34 Antikörperanfärbung zur Untersuchung der Satellitenzellpopulation, durchgeführt. CD34 dient hierbei als molekularer Marker zur

Identifikation der Satellitenzellen. Aufgrund des letalen Phänotyps der homozygoten Pax7^{loxP/Neo} und Pax7^{delta} Mäuse wurden die Tiere spätestens 48 Tage nach der Geburt analysiert.

5.2.1. Die Insertion der NeoFRT-Kassette in das 3. Intron resultiert in einem „hypomorphen“ *Pax7* Allel, dass dem Phänotyp der *Pax7^{LacZ}* Mäuse entspricht

Die erste Analyse des Phänotyps erfolgte mit der *Pax7cKO^{Neo}* Mauslinie. In dieser Mauslinie befindet sich die Neomycin Selektionskassette noch zwischen den Exonen III und IV. Diese Mauslinie stellt zwar nur einen Zwischenschritt bei der Generierung der *Pax7cKO* Linie dar, wurde jedoch aufgrund von Beobachtungen aus anderen Mausmodellen zur Untersuchung des Phänotyps hinzugezogen. Ein Beispiel für eine mögliche phänotypische Veränderung, ausgelöst durch eine inserierte Selektionskassette, ist der Phänotyp der *Myf5^{m1} Knock Out* Mutanten (Braun *et al.* 1992). Durch die Insertion einer PGK-Neo Kassette in das erste Exon des *Myf5* Gens wurde ein Phänotyp beobachtet, der durch cis-regulatorische Effekte der Selektionskassette auf das benachbarte *MRF-4* ausgelöst wurde und nicht auf das Fehlen von *Myf5* zurückzuführen war (Kaul *et al.* 2000).

Die Untersuchung des Phänotyps der *Pax7cKO^{Neo}* Mäuse ist in Abbildung 13 dargestellt. Tatsächlich lassen sich schon beim Vergleich der postnatalen Entwicklung deutliche Unterschiede zwischen den Geschwistertieren feststellen. Während zwischen der Wildtyp-Maus und dem heterozygoten *Pax7^{loxP/Neo}* Tier keine wesentlichen Größenunterschiede bestehen, ist die homozygote Mutante fast 1/3 kleiner als ihre Geschwister (Abbildung 13A) und zeigte deutliche Defizite in der Muskelentwicklung. Zudem zeigt das homozygote Tier ein fast vollständiges Fehlen der subkutanen Fettanlagen, was jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit auf die schlechte Gesamtverfassung des Tieres und die damit verbundene geringere Nahrungsaufnahme zurückzuführen ist. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass alle weiteren homozygoten Nachkommen dieser Linie (n=11), aufgrund der postnatalen Beeinträchtigungen, zwischen dem 20. und 48. Tag nach ihrer Geburt starben. Hinsichtlich dieser Beobachtungen stimmt der Phänotyp der homozygoten *Pax7cKO^{Neo}* Mäuse mit dem der bereits beschriebenen konstitutiven *Pax7^{LacZ} Knock In* Mäuse überein.

Da von dieser Mauslinie bekannt ist, dass sich der Satellitenzellpool dieser Tiere nicht erneuert und 60 Tage nach der Geburt völlig erschöpft ist, wurde von den untersuchten *Pax7cKO^{Neo}* Tieren eine Myotubenpräparation durchgeführt und die assoziierten Satellitenzellen durch eine immunhistochemische Anfärbung mit einem CD34 Antikörper sichtbar gemacht (Abbildung 13). Die Auszählung der CD34-positiven Satellitenzellen der Geschwistertiere zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Wildtyp Maus und der heterozygoten Mutante ($p > 0.5$; Abbildung 13, rechtes Diagramm), jedoch eine deutliche Abweichung gegenüber dem homozygoten Tier, dass keine einzige CD34 positive Zelle aufwies ($p < 0.0001$; Abbildung 13, rechtes Diagramm). Stattdessen konnten an den Myotuben dieses Tieres nur zelluläre Strukturen identifiziert werden, die mit der Morphologie den Satellitenzellen übereinstimmten, jedoch kein positives Signal für CD34 zeigten (Abbildung 13, Pfeile). Diese Zellen wurden als CD34-negative Satellitenzellen bezeichnet und konnten auch vereinzelt an den Myotuben der Wildtyp Maus und der heterozygoten Mutante gefunden werden. Eine Auszählung ergab eine erhöhte Anzahl dieser Zellen in der homozygoten Mutante gegenüber den anderen beiden Tieren ($p < 0.001$). Ebenfalls wurde die Verteilung der CD34-positiven und CD34-

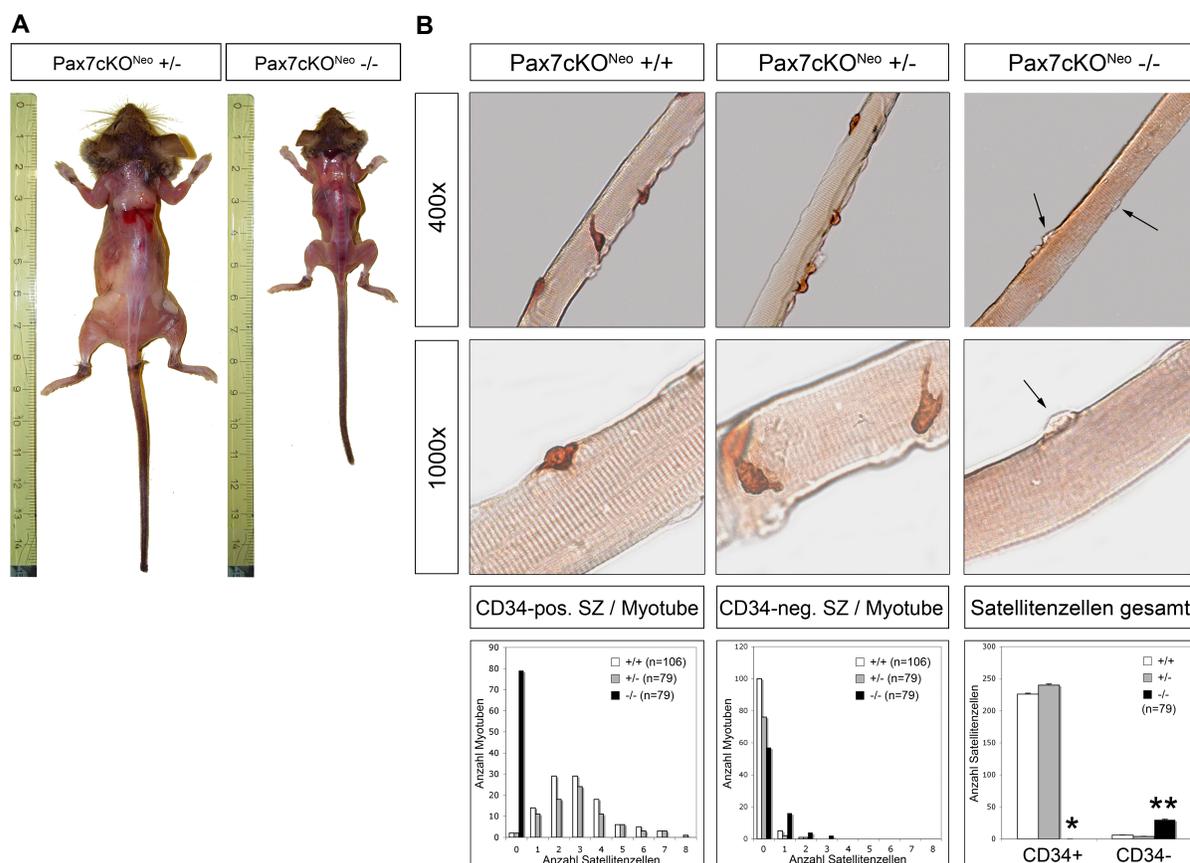


Abbildung 13. Die phänotypische Auswirkung des „hypomorphen“ $Pax7^{loxP/Neo}$ Allels auf die postnatale Entwicklung (**A**) führt zum vorzeitigen Tod der Tiere sowie einer verringerten Anzahl an CD34 positiven Satellitenzellen (**B**). Die homo- und heterozygoten sowie Wildtyp Tiere eines Wurfes der $Pax7cKO^{Neo}$ Linie wurden 48 Tage nach der Geburt analysiert. Die homozygoten Nachkommen zeigen deutliche Defizite in der postnatalen Entwicklung (**A**) und eindeutige Unterschiede in der Myotuben-assoziierten Satellitenzellpopulation. Während Gesamtzahl und Verteilung der Satellitenzellen pro Myotube zwischen den Wildtyp und heterozygoten Tieren nahezu unverändert sind, besitzen die homozygoten Nachkommen keine CD34 positiven Stammzellen (**B**). Auf den Myotuben lassen sich lediglich Strukturen erkennen, die in der Morphologie den Satellitenzellen ähneln und somit als CD34 negative Satellitenzellen bezeichnet wurden (Pfeile). SZ, Satellitenzelle(n); Signifikanz: *, $p < 0.0001$; **, $p < 0.001$.

negativen Satellitenzellen pro Myotube ermittelt und jeweils in einem Diagramm dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Verteilung in der Wildtyp Maus und in der heterozygoten Situation nahezu gleich ist und im Durchschnitt bei 2-3 Satellitenzellen pro Myotube liegt. Da die homozygoten Tiere keine CD34-positiven Zellen aufwiesen, konnte hier auch kein Verteilungsmuster ermittelt werden. Im Gegensatz dazu konnten bei diesen Tieren jedoch mehr CD34-negative Satellitenzellen pro Myotube beobachtet werden.

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Verlust der Satellitenzellen aus einer veränderten $Pax7$ Expression resultiert, sollte nachfolgend eine Untersuchung der entsprechenden Protein- und mRNA-Level erfolgen. Dazu wurde den untersuchten Tieren der *Quadriceps femoris*, der *Musculus soleus*, der *Musculus triceps brachii* und der *Musculus trapezius* sowie weitere verschiedene Proben aus der Skelettmuskulatur (div. Muskeln) entnommen und aufgearbeitet. Für Kontrollzwecke wurden

zusätzlich Teile der Leber isoliert und zusammen mit den Muskelproben untersucht. Die erste Untersuchung erfolgte mittels RT-PCR auf RNA-Ebene, um mögliche Veränderungen in der *Pax7* Transkription zu überprüfen. Dazu wurden nach der Synthese der cDNAs verschiedene PCRs durchgeführt, die jeweils einen Teil des kompletten *Pax7* Transkripts abdeckten und mit Hilfe der ImageJ Software ausgewertet wurden (Abbildung 14). Dabei zeigt sich, dass die Transkription von *Pax7*, abhängig von der Anzahl der veränderten Allele, beeinträchtigt wurde. Hauptsächlich sind davon jedoch nur die ersten drei Exone betroffen, da alle PCRs, die diese Exone überspannen eine spezifische Verringerung der PCR-Produkte aufweisen. Die gemessenen Signale betragen für die heterozygoten Tiere nur noch zwischen 73% und 50% der Wildtyp-Expression und für die homozygote Mutante sogar nur noch 1% bis 12% der Ursprungsmenge (Abbildung 14; Exon I - III, Exon I - IV, Exon I - VI, Exon II - IV und Exon II - VI). Alle PCR-Reaktionen, die alle 3' vom Intron III gelegenen Exone überspannen, zeigen hingegen keine Veränderung der Expression oder weisen nur geringe Abweichungen zwischen den einzelnen Tieren auf, die wahrscheinlich auf Mess- bzw. Pipettiergenauigkeiten zurückzuführen sind (Abbildung 14; Exon IV - VI, Exon IV - VII und Exon VII - IX). Da die Neomycin-Selektionskassette genau an dieser Schnittstelle zwischen den Exonen III und IV inseriert ist, wurden die beobachteten Veränderungen der

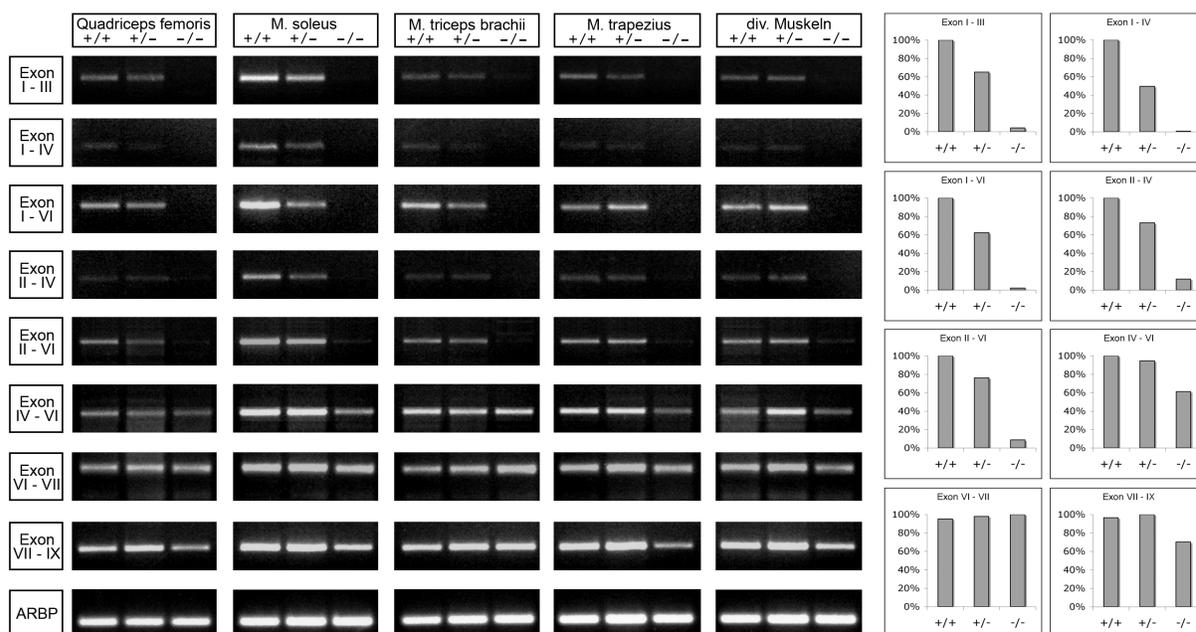


Abbildung 14. Überprüfung der Expressionslevel verschiedener cDNA-Abschnitte von *Pax7* durch RT-PCR in 48 Tage alten Mäusen der *Pax7cKO^{Neo}* Linie. Die Analyse erfolgte mit verschiedenen Primerpaaren über verschiedene Exonabschnitte. Die erhaltenen Banden wurden mittels der ImageJ Software quantifiziert und als Diagramme dargestellt. Es zeigte sich, dass eine starke Reduktion der Expression zwischen der Wildtypsituation und der Homo- bzw. heterozygoten Mutante im 5' Bereich der cDNA zwischen den Exonen I - III (+/- 65%; -/- 4%); den Exonen I - IV (+/- 50%; -/- 1%); den Exonen I - VI (+/- 62%; -/- 2%); den Exonen II - IV (+/- 73%; -/- 12%) sowie den Exonen II - VI (+/- 76%; -/- 9%) erfolgte. Die Expression der 3' vom Intron III gelegenen cDNA-Abschnitte ist hingegen nur gering bzw. gar nicht verändert (Exon IV - VI; Exon VI - VII und Exon VII - IX). Da sich im Intron III die inserierte Neomycin-Selektionskassette befindet, ist die Veränderung der *Pax7* Expression vermutlich

auf Fehler während des Splicens der prä-mRNA zurückzuführen. *M.*, *Musculus.*; *ARBP*, saures ribosomales Phosphoprotein P0.

Pax7 Expression vermutlich durch ein inkorrektes Splicen der prä-mRNA im Intron III ausgelöst. Um zu überprüfen, ob und welche Veränderungen der Translation durch die nachweislich veränderte *Pax7* Transkription ausgelöst werden, sollte in einem weiteren Versuch die Menge an gebildeten *Pax7* Protein in den einzelnen Geweben durch einen Western Blot untersucht werden. Nach Isolation der Proteine durch Homogenisierung mit einer Kugelmühle und anschließender Sonifizierung wurden jeweils gleiche Mengen des Homogenats in einem SDS-Proteingel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zur Kontrolle wurde für einen Teil der Membran ein Erstantikörper gegen das RalA Protein verwendet, das als „housekeeping“ Gen in allen Geweben in gleichen Mengen exprimiert wird und somit zur qualitativen und quantitativen Kontrolle der Homogenate dient. Für die Analyse der Menge an translatiertem *Pax7* wurde ein polyklonaler Antikörper der Firma GeneTex (Rabbit Polyclonal *Pax7*, GTX77888) sowie ein monoklonaler *Pax7* Antikörper (*Chicken Anti-Pax7; Developmental Studies Hybridoma Bank*) verwendet. Während der RalA Western Blot die erwartete Bande bei 24 kDa zeigte, konnte mit keinem der verwendeten *Pax7* Antikörpern ein spezifischer Nachweis der *Pax7* Proteine erfolgen.

Trotz dieses fehlenden Nachweises kann aufgrund des beobachteten Phänotyps und der Ergebnisse der RT-PCR davon ausgegangen werden, dass es sich bei der *Pax7cKO^{Neo}* Linie um ein „hypomorphes“ *Pax7* Allel handelt. Dies bedeutet, dass auch ohne loxP vermittelte Deletion und einem Totalverlust der *Pax7* Expression ein vergleichbarer Phänotyp, wie in den *Pax7^{-LacZ} Knock In* Mäusen, zu finden war und vermutlich auf ein fehlerhaftes Splicen, ausgelöst durch die inserierte Selektionskassette, zurückzuführen war. Diese Linie kann daher nicht zur gezielten Ausschaltung von *Pax7* verwendet werden, könnte aber bei der Aufklärung kompensatorischer Effekte anderer Gene bzw. bei der Untersuchung eines quantitativ-abhängigen Phänotyps Verwendung finden; vorausgesetzt ein spezifischer Nachweis der Translationsprodukte kann in Zukunft etabliert werden.

5.2.2. Die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion des *Pax7^{oxP}* Genlocus führt zu einem vollständigen Erliegen der *Pax7* Transkription und zu einem Verlust der Satellitenzellen

Für eine zukünftige Nutzung der *Pax7cKO* Linie, als Ausgangspunkt für eine zeitlich- bzw. gewebspezifische Ausschaltung von *Pax7*, sollte überprüft werden, ob nach einer ubiquitären Expression der Cre-Rekombinase tatsächlich ein vollständiger Verlust des Transkriptionsfaktors erfolgt. Dazu wurde durch Einkreuzung von Cre-Deleter Mäusen, die *Pax7KO* Linie erzeugt (siehe 5.1.3.3.). Für die Untersuchung des Phänotyps wurden erneut gleichgeschlechtliche Geschwistertiere verwendet, die entweder genotypisch der Wildtypsituation entsprachen, oder ein hetero- bzw. homozygotes *Pax7^{delta}* Allel trugen. Die Tiere wurden 40 Tage nach der Geburt präpariert und der Phänotyp in Abbildung 15 dokumentiert. Es zeigte sich, dass - analog zu den *Pax7cKO^{Neo}* Mäusen - Defizite in der postnatalen Entwicklung zu verzeichnen waren, die nach durchschnittlich 25 Tagen zum

Tod der Tiere führten. Im Gegensatz zu den Tieren mit heterozygoten $Pax7^{loxP/Neo}$ Allel, weisen die heterozygoten $Pax7KO$ Mäuse, im Vergleich zu den Wildtyp Tieren, bereits leichte Größenunterschiede auf. Ebenfalls unterschiedlich war die Ausprägung des Phänotyps der

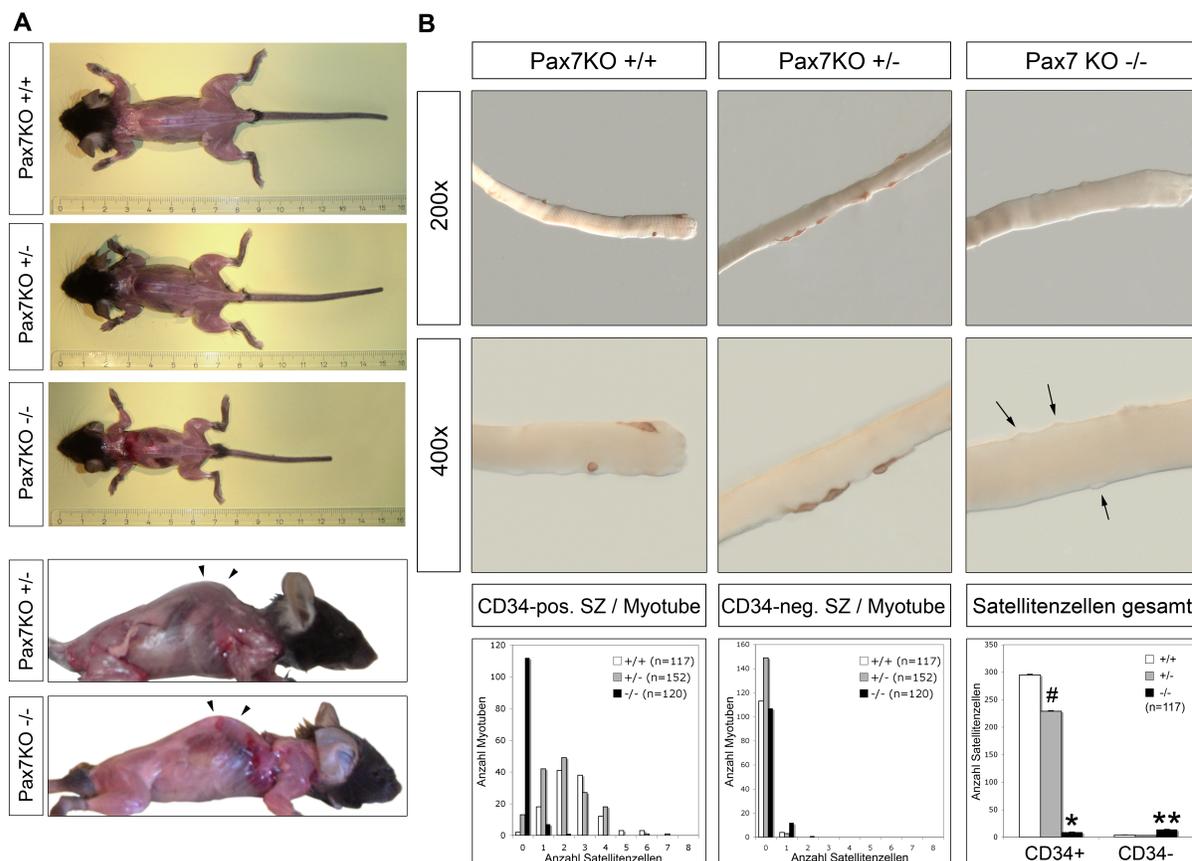


Abbildung 15. Die Untersuchung des Phänotyps der $Pax7KO$ Linie 40 Tage nach der Geburt (**A**) und Auswirkung auf die Menge und Verteilung der Satellitenzellen im *Musculus flexor* (**B**). Die Analyse erfolgte mit gleichgeschlechtlichen Nachkommen eines Wurfes und zeigte ein Wachstumsdefizit der homo- und heterozygoten Mutanten (A, oben) sowie die deutliche Ausprägung einer Kyphose (A, Pfeilköpfe). Auslöser für diesen Phänotyp ist vermutlich die beobachtete Verringerung an CD34-positiven Satellitenzellen um 22% in der heterozygoten Mutante sowie der fast vollständige Verlust der Stammzellen im homozygoten Tier (Vermin.dering um 97%). Dagegen ist die Anzahl der CD34-negativen Satellitenzellen (B, Pfeile) in der homozygoten Maus, gegenüber den anderen beiden Tieren, leicht erhöht. SZ, Satellitenzelle(n). Signifikanz: *, $p < 0.0001$; #, $p < 0.0005$; **, $p < 0.01$.

homozygoten Mutanten. Zwar zeigt die Maus gegenüber der Wildtypsituation und dem heterozygoten Geschwistertier auch einen deutlichen Unterschied in der postnatalen Entwicklung, jedoch fällt dieser nicht so dramatisch wie in der $Pax7cKO^{Neo}$ Linie aus (Abbildung 15A, oben). Neben dem Wachstumsunterschied zeigen die beiden Mutanten zudem eine ausgeprägte Kyphose, die vermutlich durch den Muskelschwund und schlechteren Allgemeinzustand der Tiere begründet ist (Abbildung 15A, Pfeilköpfe). In dieser Mauslinie wurden ebenfalls die Auswirkungen des $Pax7^{\Delta}$ Allels auf die Anzahl und die Verteilung der Satellitenzellen im *Musculus flexor* untersucht. Dafür wurden pro Genotyp mindestens 100 Myotuben isoliert und anschließend durch eine CD34 Antikörper Anfärbung nachgewiesen und ausgewertet (Abbildung 15B). Dabei zeigte sich, gegenüber der Wildtypsituation,

eine signifikante Abnahme der CD34-positiven Satellitenzellen um 23% in der heterozygoten Mutante ($p < 0.0005$) und um 97% im homozygoten Tier ($p < 0.0001$). An den Myotuben der homozygoten *Pax7KO* Maus konnte stattdessen eine größere Anzahl CD34-negativer Zellen identifiziert werden,

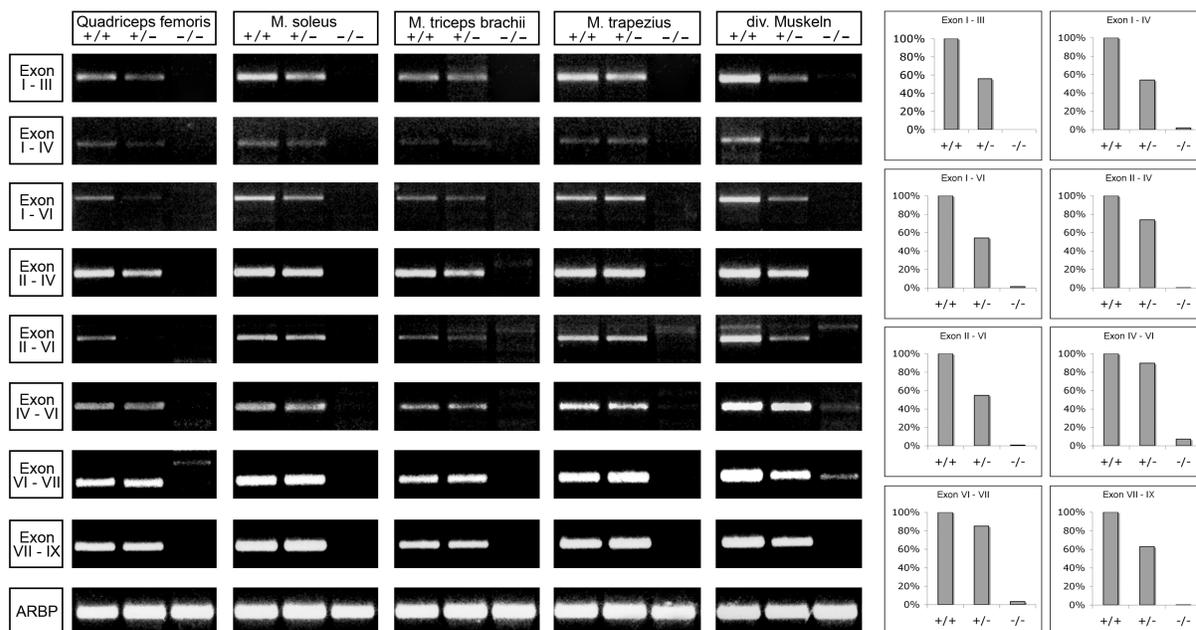


Abbildung 16. RT-PCR verschiedener *Pax7* cDNA Abschnitte in unterschiedlichen Muskelgruppen der *Pax7KO* Mauslinie, 40Tage nach der Geburt. Die Expressionslevel der einzelnen Exonabschnitte wurden mit der ImageJ Software ermittelt und als Diagramme dargestellt. Es zeigte sich dabei eine Abnahme der Expression für alle untersuchten cDNA Abschnitte in beiden Mutanten, wobei im heterozygoten Tier durchschnittlich nur noch zwischen 54% und 90% der im Wildtyp gebildeten mRNA vorhanden ist. Im homozygoten Tier lässt sich für fast alle cDNA Abschnitte keine Transkription mehr feststellen. Nur für einige Exonabschnitte, die nicht deletiert wurden, konnten noch geringe Mengen an mRNA nachgewiesen werden (3% für Exon IV - VI; 7% für Exon VI - VII). M., Musculus.; ARBP, saures ribosomales Phosphoprotein P0.

die aufgrund ihrer Morphologie und Größe als CD34-negative Satellitenzellen gewertet wurden ($p < 0.01$; Abbildung 15B, Pfeile). Eine genaue Identifikation ist aber durch den fehlenden Marker nicht möglich, bzw. müsste durch einen weiteren Satellitenzellmarker (z.B. Syndecan4) erfolgen. Auch in der Verteilung der Satellitenzellen pro Myotube konnte bereits zwischen der Wildtyp Maus und der heterozygoten Mutante ein Unterschied festgestellt werden, da die Myotuben in der heterozygoten *Pax7KO* Maus hauptsächlich eine oder zwei assoziierte Satellitenzellen besitzen, während in der Wildtypsituation die meisten Myotuben zwei bis drei der Stammzellen aufweisen. Da für die *Pax7* Mutante insgesamt nur vier CD34-positiv Satellitenzellen identifiziert werden konnten, kann eine Bewertung der Verteilung hier nicht erfolgen. In der Verteilung der CD34-negativen Zellen pro Myotube konnten hingegen keine, bzw. nur eine geringe Veränderungen festgestellt werden, die jedoch im Bereich der Normalverteilung liegt.

Die nachfolgende Analyse der *Pax7* Expression in den *Pax7KO* Mäusen wies, wie in der zuvor untersuchten Mauslinie, eine Verringerung der Transkription, abhängig von der Anzahl der mutierten Allele auf. Jedoch zeigte sich, im Gegensatz zu den *Pax7cKO^{Neo}* Mäusen, auch eine starke Reduktion

der *Pax7* cDNA Abschnitte, die 3' der inserierten Selektionskassette liegen und eigentlich nicht von der Cre vermittelten Deletion betroffen sind (Abbildung 16). Für fast alle Exonabschnitte kann in der homozygoten Mutante ein Totalverlust der *Pax7* Expression festgestellt werden. Lediglich zwischen den Exonen IV - VI und VI - VII konnten schwache PCR-Signale beobachtet werden, die jedoch nur 3% bzw. 7% der Wildtyp Expression entsprachen. Vermutlich waren diese Signale jedoch in einer unspezifischen „Rest-Transkription“ der nicht-deletierten cDNA Bereiche begründet und resultieren nicht in funktionellen *Pax7* Transkripten, die korrekt translatiert werden können. Im Falle der heterozygoten *Pax7KO* Maus ist die *Pax7* Expression durchschnittlich um 34% gesenkt, wobei zwischen den einzelnen cDNA Abschnitten große Schwankungen feststellbar sind. Jedoch sind die Abschnitte mit einer sehr geringen Veränderung auch jene, in denen in der homozygoten Mutante noch Restsignale festgestellt werden konnten (Exon IV - VI und Exon VI - VII; siehe Tabelle 4). Daher kann vermutet werden, dass auch in der heterozygoten Maus noch eine gewisse „Rest-Transkription“ der nicht-deletierten cDNA Abschnitte erfolgt und die Abschwächung der Expression kompensiert.

In den Untersuchungen mit den *Pax7KO* Mäusen konnte somit eindeutig gezeigt werden, dass eine Cre-vermittelte Rekombination im *Pax7^{loxP}* Allel zu einem Verlust der *Pax7* Transkription führt. Zwar konnte aufgrund des Fehlens eines funktionierenden Antikörpers der Verlust des *Pax7* Proteins nicht nachgewiesen werden; das vollständige Fehlen der CD34-positiven Satellitenzellen stimmt jedoch mit dem Phänotyp der bereits beschriebenen *Pax7^{LacZ} Knock In* Maus überein, die ebenfalls eine Nullmutation darstellt (Seale *et al.* 2000). Die generierte *Pax7cKO* Mauslinie kann somit als Ausgangspunkt für eine gewebespezifische und temporäre Ausschaltung des *Pax7* Gens genutzt werden.

Um einen besseren Überblick über die postnatale Entwicklung der Mutanten zu haben und gleichzeitig einen weiteren phänotypischen Vergleich zur existierenden konstitutiven *Pax7* Nullmutation zu ziehen, wurden für die Nachkommen mehrerer heterozygoten Verpaarungen der Linie *Pax7cKO^{Neo}* bzw. *Pax7KO* ab einem Alter von 7 Tagen Körpergewichtsmessungen durchgeführt (Abbildung 17). Es zeigte sich dabei, dass zwischen der Wildtypsituation und den heterozygoten Tieren beider Mauslinien keine signifikanten Unterschiede messbar waren ($p > 0.1$ *Pax7cKO^{Neo}*; $p > 0.1$ *Pax7KO*). Lediglich für die *Pax7KO* Linie zeichnete sich vom Tag 16 beginnend eine geringe Abweichung zwischen den Tieren ab. Dieser Trend scheint sich weiter fortzusetzen, da auch in den Untersuchungen der 40 Tage

Tabelle 4. Tabellarische Darstellung der relativen *Pax7* Expression verschiedener cDNA Abschnitte im Muskel der *Pax7^{delta}* und *Pax7^{loxP/Neo}* Mauslinien. Die Erstellung der Tabelle erfolgte mit Hilfe einer Image J quantifizierten und normalisierten Menge an PCR-Produkt der RT-PCR verschiedener Muskelgruppen. (+++, 75%-100% der Basalexpression; ++, 50%-74% der Basalexpression; +, 25%-49% der Basalexpression; -, 0%-24% der Basalexpression)

cDNA Abschnitt	WT/WT	WT/ <i>Pax7^{loxP/Neo}</i>	WT/ <i>Pax7^{delta}</i>	<i>Pax7^{loxP/Neo}</i> / <i>Pax7^{loxP/N}</i>	<i>Pax7^{delta}</i> / <i>Pax7^{delta}</i>
E I - III	+++	++	++	-	-
E I - IV	+++	++	++	-	-
E I - VI	+++	++	++	-	-

E II - IV	+++	++	++	-	-
E II - VI	+++	+++	++	-	-
E IV - VI	+++	+++	+++	++	-
E VI - VII	+++	+++	+++	+++	-
E VII - IX	+++	+++	++	++	-

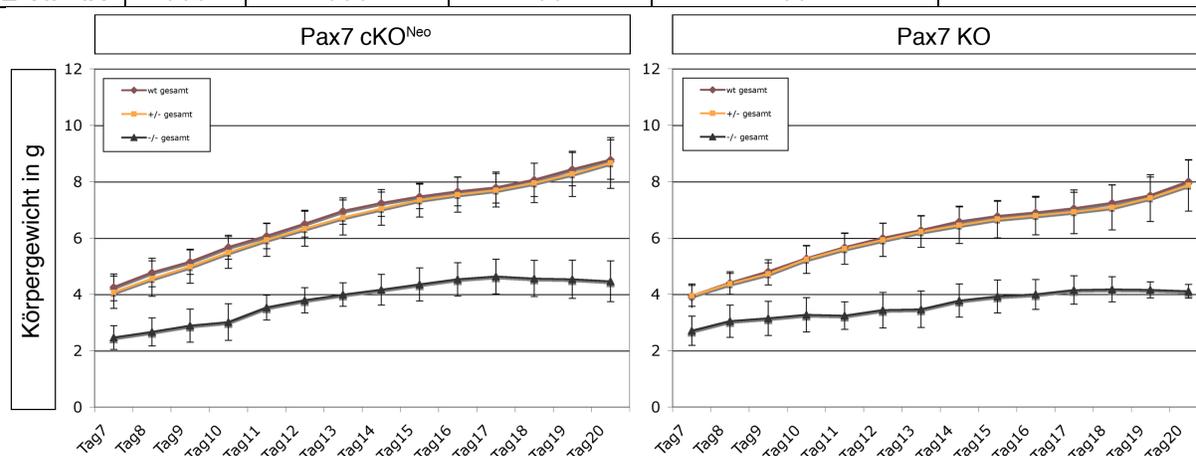


Abbildung 17. Zusammenfassung der Körpergewichtsmessungen von Nachkommen der $Pax7cKO^{Neo}$ ($n=65$) bzw. $Pax7KO$ ($n=90$) Mauslinie von Tag 7 bis Tag 20 nach der Geburt. Zwischen den Wildtyp-Tieren und den heterozygoten Mutanten ist in beiden Linien kein signifikanter Unterschied ($p > 0.1$ $Pax7cKO^{Neo}$; $p > 0.1$ $Pax7KO$) feststellbar. Die homozygoten Mäuse ($n = 10$ $Pax7cKO^{Neo}$; $n = 3$ $Pax7KO$) zeigen bereits zu Beginn der Messung deutliche Wachstumsdefizite ($p < 0.0001$ $Pax7cKO^{Neo}$; $p < 0.005$ $Pax7KO$), die im Laufe der weiteren Entwicklung konstant bleiben und im Verhältnis zur Wildtypsituation durchschnittlich 65% betragen.

alten Mäuse ein Größenunterschied beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 15). Die homozygoten Mutanten zeigen gegenüber ihren Geschwistertieren jedoch bereits ab Tag 7 einen deutlichen Gewichtsunterschied ($p < 0.0001$ $Pax7cKO^{Neo}$; $p < 0.005$ $Pax7KO$), der im Verhältnis zur Wildtypsituation ca. 65% beträgt und bis zum Tag 20 nahezu konstant bleibt. Vermutlich werden die Unterschiede ab diesem Zeitraum noch deutlicher, da ab Tag 16 bei beiden Mauslinien eine Stagnation der Wachstumskurve einsetzte. Für beide Linien war am Ende der Untersuchung bereits wieder eine Abnahme des Gewichts feststellbar, die nachfolgend zum Tod der Tiere innerhalb weniger Tage führte.

Zusammenfassend konnte anhand der Untersuchungen eine Haploinsuffizienz der heterozygoten Mutanten festgestellt werden, die zwar zu einer signifikanten Reduktion der Satellitenzellen führte, jedoch klinisch nicht auffällig ist.

5.2.3. Die Pax7cKO Mauslinie zeigt keine Veränderung in der Satellitenzellpopulation und eine Wildtyp-spezifische Pax7 Expression

In einer letzten Untersuchung sollte überprüft werden, ob die homozygoten Tiere der *Pax7cKO* Mauslinie mit Wildtyptieren, die eine „normale“ *Pax7* Expression besitzen, phänotypisch übereinstimmen, oder ob bereits die Insertion der beiden *LoxP* Erkennungsstellen in den *Pax7* Locus zu Veränderungen in den Tieren führt. Dazu wurden die Nachkommen eines Wurfes dieser Linie, wie die bereits zuvor untersuchten Tiere, 40 Tage nach der Geburt präpariert und analysiert. Die untersuchten Tiere wiesen im Gegensatz zu den vorherigen Mauslinien keine erkennbaren Größenunterschiede auf (Abbildung 18A) und zeigten auch keine erhöhte Letalität innerhalb der ersten Lebensmonate. Auch für diese Mäuse wurde eine Isolation von Myotuben aus dem *Musculus flexor* mit anschließender CD34 Antikörperanfärbung durchgeführt (Abbildung 18B). Hier zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Satellitenzellen ($p > 0.5$) zwischen dem Wildtyp und der Maus mit dem homo- bzw. heterozygoten *Pax7^{LoxP}* Allel. Nur in der Verteilung der Satellitenzellen pro Myotube sind geringfügige Unterschiede zu erkennen, die jedoch auf der natürlichen Streuung der Auszählung beruht. Von dem isolierten Muskelgewebe der untersuchten Tiere wurde anschließend eine RNA Präparation durchgeführt und mittels RT-PCR die *Pax7* Expression untersucht. Wie in Abbildung 19 zu erkennen, ist die Transkription in allen cDNA Abschnitten gleich, oder ist nur sehr gering verändert. Diese Unterschiede sind jedoch auf Mess- und Pipettierungenauigkeiten zurückzuführen und stellen keine tatsächliche Veränderung der *Pax7* Expression dar.

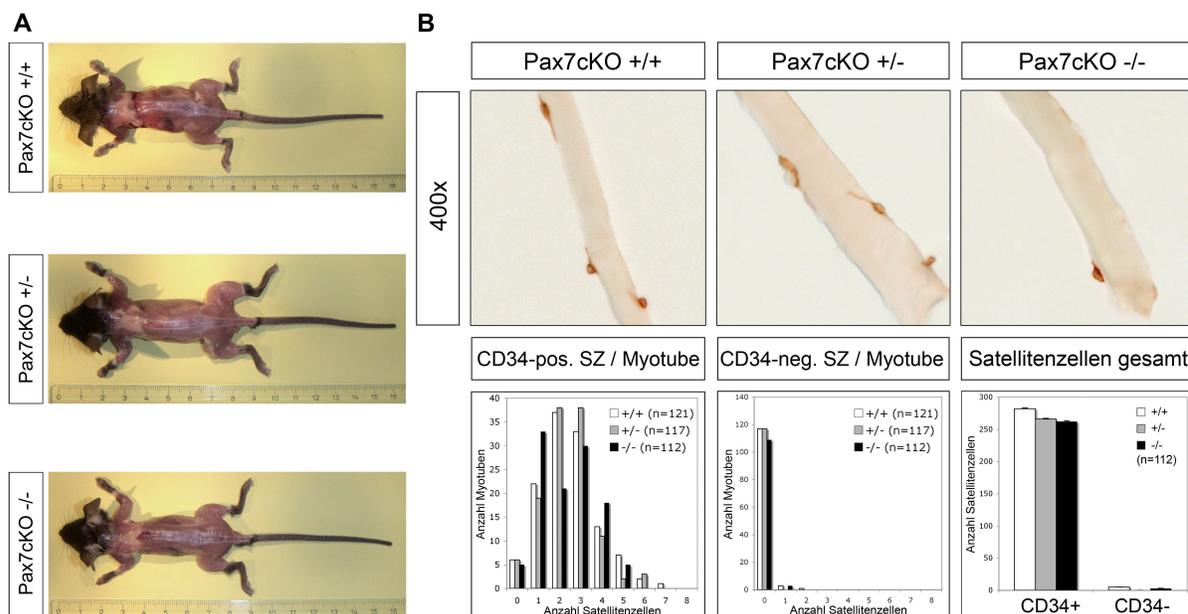


Abbildung 18. Die Tiere der *Pax7cKO* Mauslinie zeigen keine Unterschiede in der postnatalen Entwicklung (A) und zeigen eine normale Präsenz und Verteilung an Satellitenzellen (B). Die Analyse der Geschwistertiere erfolgte 40 Tage nach der Geburt und zeigte keine erkennbaren Auffälligkeiten. Zur Untersuchung der Satellitenzellen wurde eine CD34 Antikörperanfärbung durchgeführt (B), die jedoch ebenfalls keine Unterschiede in der Anzahl und Verteilung pro Myotube aufzeigte.

Da die Untersuchungen des Phänotyps sowie der Transkription der *Pax7* *CKO* Mäuse keine erkennbaren Auffälligkeiten zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass die Insertion der beiden LoxP Erkennungsstellen in den *Pax7* Locus keinen Einfluss auf die *Pax7* Expression hat. Zusammen mit den Ergebnissen der konstitutiv deletierten *Pax7KO* Linie (5.2.2.) konnte somit erfolgreich demonstriert werden, dass eine vollständige Ausschaltung von Pax7 erst nach Expression der Cre Rekombinase erfolgt, ansonsten aber dem Wildtyp entspricht.

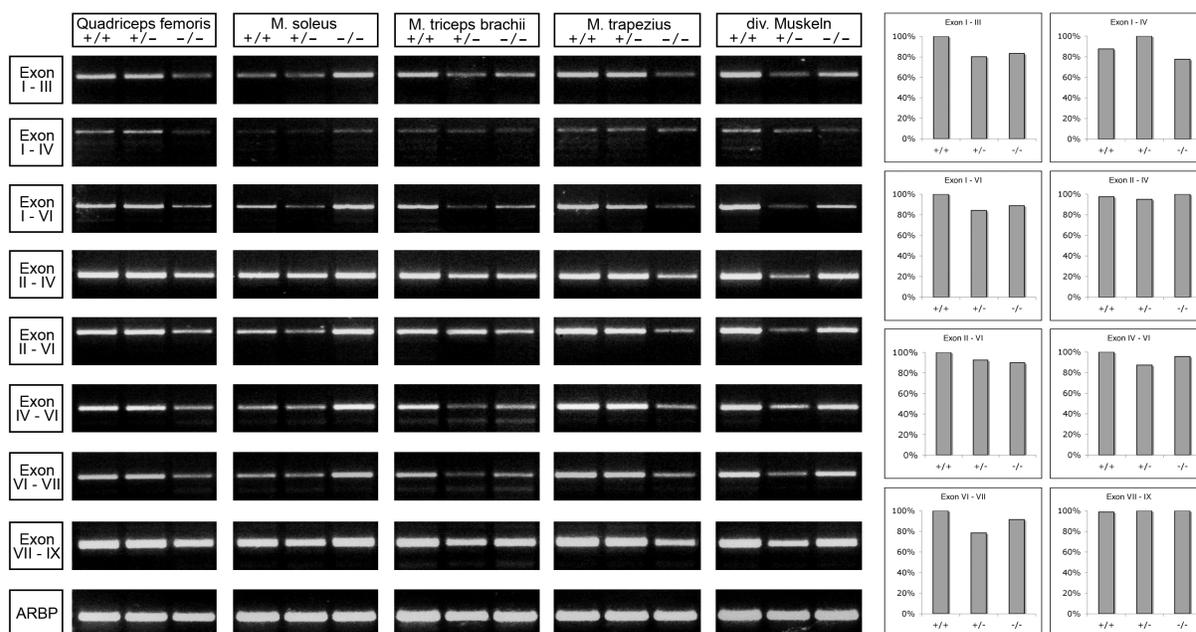


Abbildung 19. Die Analyse der *Pax7* Expression in verschiedenen Muskelgeweben von *Pax7cKO* Mäusen zeigte keine Veränderung zwischen der Wildtypsituation sowie der homo- bzw. heterozygoten Mutante. Die Ermittlung der Expressionslevel verschiedener Exonabschnitte erfolgte 40Tage nach der Geburt und wurde mit der ImageJ Software ausgewertet. Trotz geringfügigerer Schwankungen innerhalb der einzelnen Gewebe, konnte keine signifikante Abnahme der Expression in den untersuchten Tieren festgestellt werden. M., Musculus.; ARBP, saures ribosomales Phosphoprotein P0.

5.3. Charakterisierung der VITO-Genfamilie

Durch vorangegangene Untersuchungen konnte mittels subtraktiver Hybridisierung das humane cDNA-Fragment *hVITO-1* (*Homo sapiens mRNA for VITO1 protein, EST name: AJ578053; GenBank gi: 33235473*) isoliert werden, welches beim Menschen ausschließlich in Skelettmuskeln exprimiert wird. Sequenzvergleiche mit der NCBI EST-Datenbank zeigten hohe Homologien zum humanen *Tondu* und zum *Vestigial* Gen in *Drosophila melanogaster*. Besonders hohe Homologien zeigten sich dabei in einem Bereich von 28 Aminosäuren - der SID („scalloped interaction domain“). Diese ist verantwortlich für die Bindung von *Scalloped* bzw. Mitgliedern der TEF Familie.

Durch Sequenzvergleiche von *hVITO-1* mit den entsprechenden Maus EST-Klonen konnte ein Kandidat für die homologe Maus cDNA gefunden werden (*RIKEN full-length enriched, 12 days embryo head; EST name: BB567795; GenBank gi: 11458703*). Mit Hilfe einer erweiterten Suche in der NCBI Maus-EST-Datenbank konnte zudem ein weiterer EST-Klon mit einer 93% Homologie auf Aminosäureebene innerhalb der Scalloped Interaktionsdomäne identifiziert werden, der als *mVITO-2* bezeichnet wurde (*RIKEN cDNA, Mammary tumor. WAP-TGF alpha model. 7 months old, gross tissue; EST name: BC042696; GenBank gi: 27769075*). Für diesen cDNA-Klon existiert ebenfalls ein humaner cDNA-Klon, der als *hVITO-2* benannt wurde (*NIH_MGC_79 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4731481 5', mRNA sequence, EST name: BG620384; GenBank gi: 13671755*).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob es sich bei diesen Kandidaten tatsächlich um Mitglieder einer Gen-Familie handelt und anschließend die Eigenschaften und Funktion der VITO Proteine im Modellorganismus Maus untersucht werden.

5.3.1. Sequenzanalyse und -vergleiche von *mVITO-1* und *mVITO-2*

Die Vektoren mit den verschiedenen cDNA-Klonen wurden aufgereinigt, sequenziert und anschließend mit den Sequenzen aus der NCBI-Datenbank abgeglichen. Mit Hilfe der Sequenzen konnte nun ein Homologievergleich zwischen den Klonen auf DNA- sowie Aminosäureebene durchgeführt werden. Dabei zeigte sich, dass der Bereich der höchsten Homologie im Bereich der Scalloped Interaktionsdomäne liegt und ein Unterschied in der Aminosäuresequenz zwischen allen EST-Klonen hier nur an 2 Stellen (92,6%) erkennbar ist (siehe Abbildung 20). Zwischen *mVITO-1* und *hVITO-1* sowie *mVITO-2* und *hVITO-2* besteht sogar eine 100%ige Übereinstimmung in der SID. Die Homologie zwischen *VITO-1* und *VITO-2* über den kompletten offenen Leserahmen liegt auf Aminosäureebene bei den humanen Sequenzen im Bereich von 41,7%, bzw. von 37,2% bei den Maus-EST-Klonen (siehe Abbildung 21C). Auf DNA-Ebene beträgt die Homologie der humanen cDNAs nur 26,8% sowie 28,3% bei den Maus-Sequenzen (siehe Abbildung 21D).

Zwischen den jeweiligen humanen und murinen Vertretern von *VITO-1* und *VITO-2* besteht über den vollständigen ORF jedoch eine deutlichere Ähnlichkeit von 87,3% bzw. 90,5% in der Aminosäuresequenz (siehe Abbildung 21C). Auf DNA-Ebene existiert ebenfalls eine deutlich höhere Ähnlichkeit von 48,8% für *VITO-1*, bzw. 51,4% bei *VITO-2* (siehe Abbildung 21D).

MSCLDVMYQVYGGPPQPYFAAAAY-----TPY-----HQLLAYYSKMQEAQECNASPSSSGSGSSSFSSQTP	hVITO-1
MSCLDVMYQVYGGPPQPYFAAAAY-----TPY-----HQLLAYYSKMQEAQEC-ASPGSSASGSSSFNSNPTP	mVITO-1
MSCLDVMYQVYGGPPQPYFAAAAY-----TPY-----HQLLAYYSKMQEAQEC ASP:SS:SGSSSFs:.TP	Kons. VITO-1
MSCAEVMYH---PQPYGASQYLNPMAATTCTPAYQPAPQPGQKKLAVFSKMQDSLEV-TLPSKQEEED-----	hVITO-2
-----MQDSLEV-TLPSKQEEEE-----	mVITO-2
MQDSLEV-TLPSKQEEEE:-----	Kons. VITO-2
MSC :VMY:VYGPQPY A:.YLNPMAATTCT:YYQPAPQPGQ::KLA :SKMQ:: E N: P:. . . :SSFS:.TP	Kons. gesamt
ASIKKEEG---SPEKERPPEAEYINSRCVLFTYFQGDISSVVEHFSTRALGQPSSYSPTSSKAPRSSGP-WR-DCSFP	hVITO-1
ASVKEEG---SPEKERPPEAEYINSRCVLFTYFQGDISSVVEHFSTRALGHPSSYTPSCTSSKAHRSSGP-WRAEGTFP	mVITO-1
AS:KEEG---SPEKERPPEAEYINSRCVLFTYFQGDISSVVEHFSTRALG:PSSY:PSCTSSKA.RSSGP-WR : :FP	Kons. VITO-1
----EEEE---EEEKQPAEMEYLNSRCVLFTYFQGDIGSVVEHFSTRALGQAITLHPESAISKSMGLTPLWRDSSALS	hVITO-2
----EEEEDEEEEKQPAEMEYLNSRCVLFTYFQGDIGSVVEHFSTRALGQANTLHPESAISKSMGLTPLWRDSSALS	mVITO-2
----EEEE---EEEKQPAEMEYLNSRCVLFTYFQGDIGSVVEHFSTRALGQA TLHPESAISKSMGLTPLWRDSSALS	Kons. VITO-2
AS:KEEG.DEE. EK::P:E EY:NSRCVLFTYFQGDIGSVVEHFSTRALG:: : P.: SK: .: .PWR.. ::	Kons. gesamt
MSQRSFPASFWNSAYQAPVPPPLGSPPLATAHSELFFAAADPYSIPAALHGHHLHQGATEPWHHAHPHHAHPHPHYALGGA--	hVITO-1
MSQRSFPASFWNSAYQAPVPAPLGSPLAAHSELFFA-TDPYSPATLHGHHLHQGAAD-WHHAHPHHAHPHPHYALGGA--	mVITO-1
MSQRSFPASFWNSAYQAPVP:PLGSPLA:AHSELFFA: DPYSPA:LHGHHLHQGA:: WHHAHPHHAHPHPHYALGGA--	Kons. VITO-1
SQRNSFPTSFWTSSYQPPAPCLGG---VHPD-----FQVTGPPGTFSAADPSWPGHNLHQTGPAPPPAVSESWP	hVITO-2
SQRNSFPTSFWTSSYQPPAPCLGG---VHPD-----FQVTAPHGFTTTADPNWPGHGLHQTGPAPPPATASESWH	mVITO-2
SQR::FPTSFWTSSYQPPAPCLGG---VHPD-----FQVT:P.GTF::ADP::WPGH.LHQTGPAPPP:.SESW.	Kons. VITO-2
:::FP:SFWS:YQ:P :P LG:PLA:.H::LPFA:-DP: .: .G : :... W. H:::P .P :...:W.	Kons. gesamt
--LGAQAAPYPRPAAVHEVY-----APHFDPRYGPLLMPAASGRPARLATAPAPAGSPP	hVITO-1
--LGAQASAYPRPA-VHEVY-----APHFDPRYGPLLMPAATGRPRLAPASAPAGSPP	mVITO-1
--LGAQA::YPRPA VHEVY-----APHFDPRYGPLLMPAA:GRP:RLA.A:APAGSPP	Kons. VITO-1
YPLTSQVSP-SYSH-MHDVYMRHHHPAHMHRHRHHHHHHHPAGSALDPSYGPLLMPVSHA-----ARIPAPQCDITK	hVITO-2
YPLASQVSP-SYSH-MHDYLRHHHPAHVHHRH---HHHHPTAGSALDPAYGHLLMPVSHA-----ARIPAPQCDITK	mVITO-2
YPL:SQVSP-SYSH-MHD:Y:RHHHPAH:HH:H---HHHHPT.AGSALDP:YG.LLMPV:A-----ARIPAPQCDITK	Kons. VITO-2
YPL.:Q.:Y: :A:H::Y:RHHHPAH:HHRHRHHHHHHHP.A:::DP.YG.LLMP:.:RP:RLA :AP: .:	Kons. gesamt
CELSGKGEPAWAWAGPGPFASPSGDVAQGLGLSVDSARRYSLGG-----ASLLS	hVITO-1
CELAAGKGEPAWAWAGPGPFVSPGTDVAQSLGLSVDSGKRRRECSLPSAPPALYPTLG.	mVITO-1
CEL::KGEPAW:AWA:PGPF.SP:GDVAQ:GLSVDS::R : C:	Kons. VITO-1
TEPTT-VTSATSAWAGA---FHG-TVDIVPSVGFDTGLQHODKSKE-----SPWY	hVITO-2
TDLTT-VTTATSAWAGA---FHG-TVDIVPSVGFDTGLQHODKSKE-----STWY.	mVITO-2
T: TT-VT:ATSAWAGA---FHG-TVDIVPSVGFDTGLQHODKSKE-----S.WY	Kons. VITO-2
: :.K .:A.:AWA::GGPF :P: D:..:G:..: .: . .LPSAPPALY	Kons. gesamt

Abbildung 20. Der Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Vertreter der VITO Genfamilie im Menschen und in der Maus. Für die einzelnen Vertreter der VITO Genfamilie wurde eine Konsensussequenz erstellt (Kons. VITO-1 bzw. Kons. VITO-2), welche die Nähe der Verwandtschaft zwischen der humanen und der Maus-Sequenz verdeutlicht. Übereinstimmende Aminosäuren wurden in der Konsensussequenz beibehalten, während Fehlpaarungen je nach evolutionärer Verwandtschaft (PAM250 Tabelle; Dayhoff et al. 1978) durch ein Leerzeichen (entfernter Verwandtschaftsgrad; PAM250-Wert < 0), Punkt (neutrale Aminosäure; PAM250-Wert = 0) oder Doppelpunkt (naher Verwandtschaftsgrad; PAM250-Wert > 0) geändert wurden. Der Bereich der Scalloped Interaktionsdomäne wurde mit roten Buchstaben gekennzeichnet. Lediglich zwei Aminosäuren innerhalb der SID sind verändert (grüne Kennzeichnung) und zeigen zudem eine relativ nahe Verwandtschaft (PAM250-Wert +1). Die Domäne repräsentiert gleichzeitig den Bereich der höchsten Homologie (92,6%) zwischen allen vier VITO Genen (Kons. gesamt; grau hinterlegt). Die Erstellung der Konsensussequenz erfolgte entsprechend den vorangegangenen Angleichungen. Sequenzabschnitte, die nur bei einer cDNA vorhanden sind, wurden zusätzlich weiß gekennzeichnet.

Aufgrund der Ähnlichkeitsbeziehungen kann für die einzelnen cDNA Sequenzen der potentiellen VITO-Gene ein phylogenetischer Baum erstellt werden, der die evolutionären Beziehungen zwischen den Sequenzen verdeutlicht. Der entsprechende phylogenetische Baum für die Nukleotid-Sequenz der offenen Leserahmen ist in Abbildung 21A dargestellt, während die verwandtschaftliche Beziehung auf Aminosäureebene in Abbildung 21B abgebildet ist.

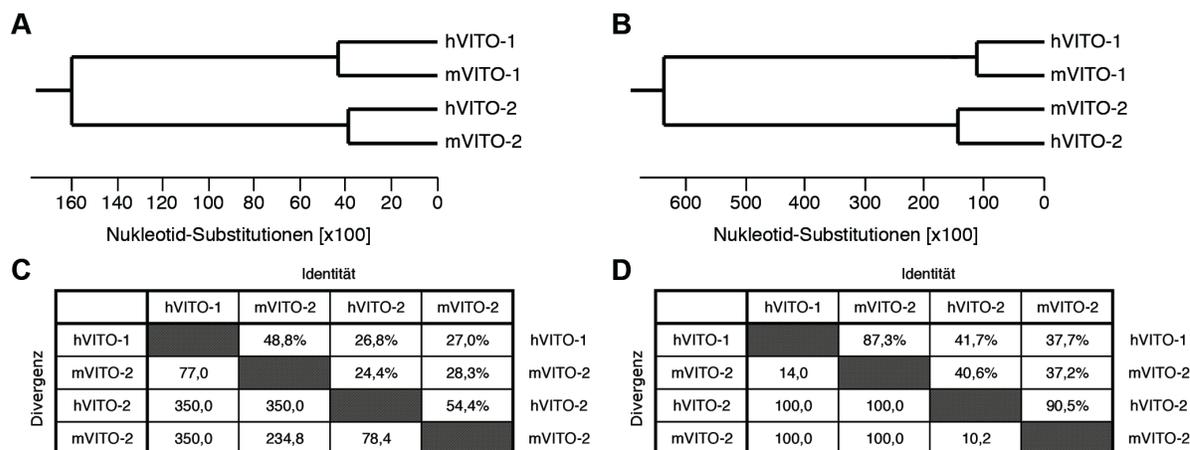


Abbildung 21. Berechnete evolutionäre Beziehung der VITO Genfamilie. Für alle offenen Leserahmen der VITO cDNAs (A, C) und der daraus resultierenden Aminosäuresequenzen (B, D) wurden jeweils der phylogenetische Baum (oben) und die Identität sowie Divergenz (unten) mit Hilfe des Programms „Megalalign“ erstellt. **A, B:** Der phylogenetische Baum verdeutlicht die evolutionären Beziehungen zwischen den verschiedenen Sequenzen, wobei die Länge jedes Verzweigungspaares den evolutionären Abstand zwischen den verglichenen Sequenzpaaren repräsentiert und die Skala die Anzahl an Basen-Substitutionen angibt. Dabei zeigt sich sowohl für die Aminosäure- wie auch DNA-Sequenz das typische Bild einer Genfamilie, wobei ersichtlich wird, dass die evolutionäre Trennung der einzelnen Vertreter noch vor der Trennung der Spezies erfolgt sein muss. **C, D:** Tabellarische Darstellung der Identität sowie der Divergenz der Vertreter der VITO Genfamilie. Die Divergenz wird durch den Vergleich der Sequenzpaare unter Berücksichtigung der berechneten Phylogenie ermittelt, während die Identität ausschließlich auf dem Vergleich der Sequenzen beruht. Auch hier zeigt sich die höchste Ähnlichkeit zwischen den humanen und Maus-Sequenzen der einzelnen Vertreter der Genfamilie, sowohl auf DNA- wie auch Aminosäure-Ebene, während die Unterschiede zwischen VITO-1 und VITO-2 in der Maus und im Menschen deutlich größer sind.

5.4. Nachweis der Interaktion von mVITO-1 und mVITO-2 mit Transkriptions-faktoren der TEF-Familie

Durch die vorangegangenen Untersuchungen der DNA und Aminosäuresequenz von mVITO-1 und mVITO-2 zeigte sich, dass die höchste Homologie, sowohl auf Aminosäure- und DNA-Ebene, im Bereich der Scalloped Interaktionsdomäne liegt. Diese Beobachtungen legen nahe, dass dieser Abschnitt für die Funktion der beiden Gene eine entscheidende Rolle spielt und deshalb evolutionär konserviert wurde. Aus Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* konnte bereits gezeigt werden, dass das VITO-Homolog Vestigial den Transkriptionsfaktor Scalloped bindet, und dass dieser Prozess für entscheidende Schritte in der Entwicklung der Flügel- und Flugmuskulatur notwendig ist. Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass das Fehlen von Scalloped durch das humane Homolog NTEF-1 kompensiert werden kann. Aufgrund dieser Beobachtungen und der Tatsache, dass auch die Aminosäuresequenz der Scalloped Interaktionsdomäne der VITO cDNAs eine sehr hohe Konservierung aufzeigt, konnte vermutet werden, dass auch die VITO Proteine mit den Transkriptionsfaktoren der TEF-Familie interagieren können.

Um zu Überprüfen, ob diese Vermutung richtig ist und ob der hohen evolutionären Konservierung der SID auch tatsächlich eine biologische Funktion zukommt, war das Ziel der ersten biochemischen Untersuchungen der beiden Genprodukte, der Nachweis einer Interaktion von VITOs mit Vertretern der TEF-Proteine mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation.

5.4.1. Herstellung der VITO Expressionskonstrukte

Für die Durchführung der Co-Immunopräzipitation war es notwendig die entsprechenden Proteine mittels einer *in vitro* Translation in ausreichenden Mengen herzustellen. Die humanen cDNAs von TEF-1 und TEF-3 wurden bereits von I. Davidson in den *pxJ40* Expressionsvektor kloniert und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der VITO Expressionskonstrukte wurden verschiedene Abschnitte der cDNAs in den *pCS2* + MT Vektor kloniert. Dieser Vektor enthält neben den Promotersequenzen für die Sp6- und T7-Polymerase zwei multiple Klonierungsstellen, zwischen denen sich eine sechsfache Kopie der „Myc-Tag“ Epitopsequenz befindet. Die Sequenz des Myc-Epitops (5'-ATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAA-3'; MEQKLISEEDLNE) codiert das Myc-Antigen, welches spezifisch vom monoklonalen myc1-9E10.2 Antikörper erkannt wird. Durch die Klonierung der cDNA-Abschnitte in das Leseraster der Myc-Sequenz können somit Fusionsproteine mit einem N-terminalen Myc-Tag hergestellt werden. Da gegen die VITO Proteine weder poly- noch monoklonale Antikörper erhältlich sind, erlauben die eingeführten Myc-Epitope eine Detektion der VITO Fusionsproteine durch den Myc-Antikörper und machen somit eine Immunopräzipitation möglich.

Die verschiedenen cDNA-Abschnitte wurden mit Hilfe einer PCR amplifiziert, wobei die Primer zusätzliche EcoRI Restriktionsschnittstellen für die Klonierung der Fragmente in den *pCS2* +MT Vektor enthielten. Für den Nachweis der Interaktion wurden insgesamt je 3 verschiedene cDNA-Fragmente

von mVITO-1 und mVITO-2 verwendet, die entweder die komplette cDNA oder verkürzte Abschnitte beinhalten (siehe Abbildung 22). Die verkürzten Konstrukte waren zum Nachweis der Notwendigkeit der SID für die TEF-Interaktion erforderlich. Dazu wurde jeweils ein am 5'-Ende deletiertes cDNA-Fragment verwendet, welches in einem verkürzten N-terminalen Protein ohne die Scalloped Interaktionsdomäne resultiert. Durch die Klonierung von VITO cDNAs mit einer Deletion am 3'-Ende konnten dagegen Proteine synthetisiert werden, welche die vollständige SID besitzen, jedoch am C-terminalen Ende verkürzt waren.

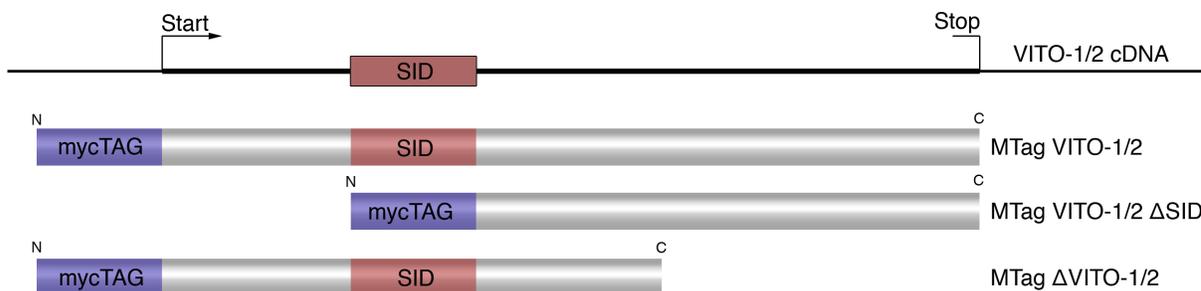


Abbildung 22. Bildliche Darstellung der verschiedenen hergestellten VITO Expressionskonstrukte, die für diese Arbeit verwendet wurden. Im oberen Teil wurde noch einmal der schematische Aufbau der cDNAs von mVITO-1 und mVITO-2 mit der Scalloped Interaktionsdomäne (SID, rot) dargestellt. Im unteren Teil sind die resultierenden Translationsprodukte, zusammengesetzt aus den entsprechenden cDNA-Abschnitten und dem Myc-Epitop (blau), aufgeführt. Es wurden sowohl die kompletten cDNAs sowie 5'- und 3'-verkürzte Fragmente verwendet, die in vollständigen bzw. N- oder C-terminal deletierten Fusionsproteinen resultierten.

5.4.2. Zur Interaktion von mVITO-1 mit TEF-1 *in vitro* wird die SID benötigt

Zur Durchführung der Co-Immunopräzipitation wurden die verschiedenen Expressionskonstrukte der TEF-Proteine sowie die Fusionskonstrukte von mVITO-1 und mVITO-2 mit Hilfe eines Retikulozytenlysat-Kits (TnT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega) *in vitro* translatiert.

Die *in vitro* Translation von TEF-1 (Abbildung 23, Bahn 3) und TEF-3 (Abbildung 24, Bahn 3) sowie den Fusionsproteinen MTag mVITO-1 (Abbildung 23, Bahn 4), MTag mVITO-1 ΔSID (Abbildung 23, Bahn 5) und MTag ΔmVITO-1 (Abbildung 23, Bahn 6) war erfolgreich und resultierte in den erwarteten Proteingewichten von 45,2kDa für das vollständige VITO-1 Fusionsprotein, bzw. 33,3kDa und 32,6kDa für die N-terminal und C-terminal verkürzten Konstrukte. Lediglich bei TEF-1 und TEF-3 weicht der errechnete Wert von 46,3kDa für TEF-1 bzw. 44kDa für TEF-3 vom tatsächlichen Proteingewicht ab und liegt etwas niedriger bei ca. 40kDa. Diese Beobachtung lässt sich aber damit erklären, dass die Berechnung des Proteingewichtes durch einfache Addition der Molekulargewichte der einzelnen Aminosäuren erfolgt und somit spezifische Eigenschaften der Proteine nicht berücksichtigt werden.

Die Verwendung des Myc-Antikörpers erlaubt eine spezifische Detektion und Präzipitation der VITO Fusionsproteine (Abbildung 23, Bahnen 9-11), während die TEF-Proteine nicht präzipitiert werden können (Abbildung 23, Bahn 12; Abbildung 24, Bahn 12). Somit können bei der eigentlichen Co-Immunopräzipitation detektierte TEFs nur auf direkte Interaktion mit den VITO-Fusionsproteinen

zurückzuführen sein. Da die erwartete Proteingröße von TEF-1 und TEF-3 mit der vom vollständigen MTag-VITO-1 nahezu übereinstimmte und somit zu erwarten war, dass die beiden Proteinbanden im Gel nicht unterschieden werden können, wurde für die Co-Immunopräzipitation zusätzlich ein Fusionsprotein ohne radioaktives Methionin translatiert und verwendet (Abbildung 23, Bahn 2).

Tatsächlich zeigt sich bei der Co-Immunopräzipitation zwischen TEF-1 und dem unmarkierten unverkürzten VITO Protein eine Interaktion (Abbildung 23, Bahn 13). Zwar konnten aufgrund der fehlenden radioaktiven Markierung von MTag-VITO-1 nicht beide Proteine gleichzeitig nachgewiesen werden, jedoch ist durch die Kontroll-Präzipitation von TEF-1 in Abbildung 23, Bahn 12 eine unspezifische Detektion von TEF-1 ausgeschlossen. Die TEF-1 Proteine konnten somit nur durch Bindung an das unmarkierte MTag-VITO-1 mit der Sepharose präzipitiert werden. Auch mit dem C-

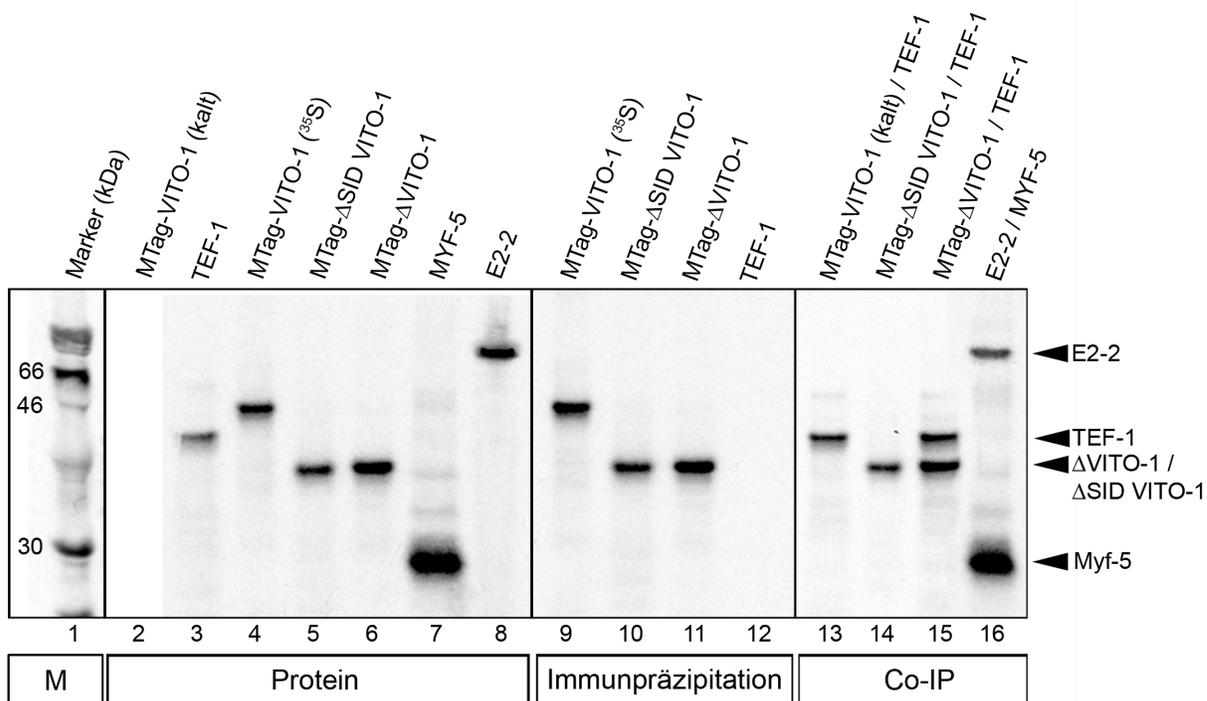


Abbildung 23. Die Co-Immunopräzipitation von TEF-1 mit mVITO-1 ist von der Scalloped Interaktionsdomäne (SID) abhängig. Autoradiographischer Nachweis einer SDS Gel-Elektrophorese verschiedener mVITO-1 Myc-Tag Fusionsproteine sowie TEF-1, Myf5 und E2-2. Zur Kontrolle der *in vitro* Translation wurde jeweils 1 μ l der Retikulozytenlysate auf das Gel aufgetragen (Bahnen 2-8). In einer Kontroll-Präzipitation (Bahnen 9-12) zur Überprüfung unspezifischer Protein-Antikörper Wechselwirkungen wurden je 10 μ l des Translationsansatzes mit 5 μ l Myc-Antikörper präzipitiert und aufgetragen. Für die Co-Immunopräzipitation wurde ebenfalls je 10 μ l der translatierten Proteine miteinander inkubiert und anschließend mit dem Myc-Antikörper in Sepharose präzipitiert (Bahnen 13-16). Da die berechneten Proteingewichte von TEF-1 und dem MTag-VITO-1 Fusionsprotein nahezu gleich waren, wurde für diese Co-Präzipitation (Bahn 13) ein unmarkiertes VITO Protein (Bahn 2) eingesetzt. Aufgrund der negativen Kontroll-Präzipitation mit TEF-1 in Bahn 12, demonstriert die Co-Immunopräzipitation in Bahn 13 eindeutig eine spezifische Interaktion zwischen TEF-1 und mVITO-1. Bei der Co-Immunopräzipitation von TEF-1 und dem VITO Fusionsprotein ohne die SID konnte hingegen keine spezifische Interaktion nachgewiesen werden, was die Notwendigkeit der SID für die TEF-Bindung unterstreicht (Bande 14). Dagegen hat eine C-terminale Verkürzung des VITO-1 Proteins mit vollständiger SID keine Auswirkungen auf die TEF-Bindeeigenschaften (Bahn 15). Als Positiv-Kontrolle wurden die Proteine Myf5 (Bahn 7) und E2-2 (Bahn 8) mit einem E2-2 Antikörper copräzipitiert (Bahn 16).

terminal verkürzten VITO-1 Fusionsprotein war eine Interaktion nachweisbar (Abbildung 23, Bahn 15). Diese Beobachtung war zu erwarten, da die Scalloped Interaktionsdomäne vollständig vorhanden war, während eine vollständige Deletion der SID im MTag mVITO-1 Δ SID Fusionsprotein eine Co-Immunopräzipitation mit TEF-1 verhinderte (Abbildung 23, Bahn 14).

Der gleiche Versuch wurde auch für TEF-3 durchgeführt, wobei hier keine Interaktion mit allen MTag-VITO-1 Fusionsproteinen nachgewiesen wurde (Abbildung 24, Bahnen 13-15), obwohl auch hier die Positiv- und Negativkontrolle zu den erwarteten Ergebnissen führte. Die Negativkontrolle bestand auch in diesem Versuch aus einer Präzipitation des translatierten TEF-3 mit dem Myc-Antikörper, wobei eine Detektion von TEF-3 ausblieb (Abbildung 24, Bahn 12). Als Positivkontrolle wurden jeweils parallel zur Co-Immunopräzipitation ebenfalls *in vitro* translatiertes Myf5 und E2-2 mit einem E2-2 Antikörper präzipitiert, da bekannt war, dass beide Proteine *in vitro* interagieren (Braun und Arnold, 1991). Es konnte dabei in beiden Versuchen eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen nachgewiesen werden, was sicherstellt, dass die Reaktionsbedingungen für eine *in vitro* Co-Präzipitation gegeben waren (Abbildung 23, Bahn 16; Abbildung 24, Bahn 16).

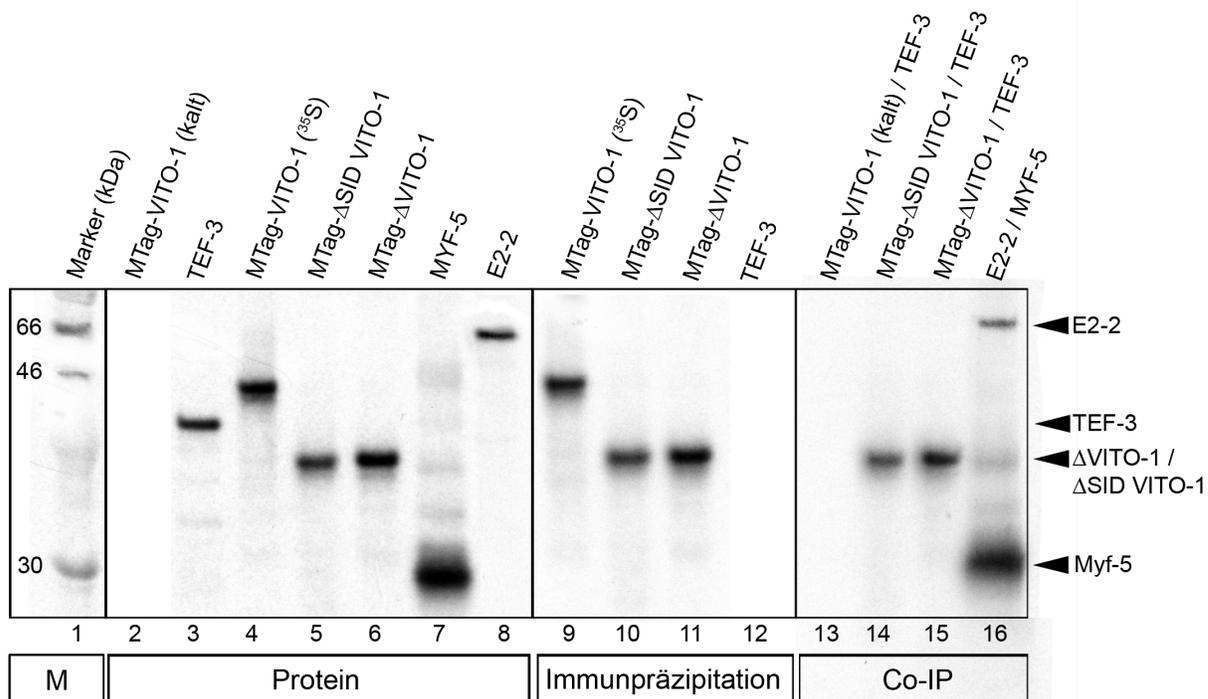


Abbildung 24. Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation von TEF-3 mit mVITO-1. Zur Untersuchung einer möglichen Interaktion mit TEF-3 wurden drei verschiedene Fusionsproteine von VITO-1 verwendet, die bereits zum Nachweis der TEF-1 Co-Präzipitation genutzt wurden (siehe Abbildung 23). Zum Nachweis der Spezifität des Myc-Antikörpers und somit der ausschließlichen Präzipitation der VITO-1 Fusionsproteine wurde eine Kontroll-Präzipitation mit jeweils 10 μ l Translationsprodukt und 5 μ l Antikörper durchgeführt (Bahnen 9-12). Da auch in diesem Versuch eine Überschneidung im Proteingewicht zwischen TEF-3 und dem unverkürzten VITO-1 Fusionsprotein zu erwarten war, wurde auch hier zur Co-Immunopräzipitation ein unmarkiertes VITO Translationsprodukt verwendet (Bahn 2, 13). In diesem Versuch war es jedoch nicht möglich eine *in vitro* Interaktion von TEF-3 mit einem der VITO-1 Proteine nachzuweisen (Bahnen 13-15), obwohl die Positivkontrolle, in Form einer Myf5/E2-2 Co-Präzipitation, das erwartete Resultat zeigte (Bande 16).

Zusammenfassend konnte durch die Co-Immunopräzipitation eine direkte Interaktion zwischen VITO-1 und TEF-1 nachgewiesen werden. Die Fähigkeit TEF-1 zu binden wird dabei ganz entscheidend von der Existenz der Scalloped Interaktionsdomäne beeinflusst, da beim Fehlen der SID keine Co-Präzipitation erfolgt. Eine Interaktion mit TEF-3 konnte nicht nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Selektivität von mVITO-1 für das TEF-1 hindeutet. Jedoch weisen weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit (siehe 5.5.2. Die Interaktion von mVITO-2 mit TEF-1 und TEF-3 führt zur Aktivierung MCAT-abhängiger Reporter) sowie die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Maeda *et al.*, 2002) dennoch auf eine Interaktion von VITO-1 mit TEF-3 hin.

5.4.3. Die Bindung von TEF-1 mit mVITO-2 erfolgt durch die SID

Durch die hohe Homologie zwischen *mVITO-1* und *mVITO-2* auf DNA- und Aminosäureebene, wurde angenommen, dass auch mVITO-2 zur Bindung der TEF Transkriptionsfaktoren fähig ist. Um diese These zu überprüfen, wurden analoge Co-Immunopräzipitationen mit mVITO-2 durchgeführt. Es wurden ebenfalls Expressionskonstrukte im *pCS2* +MT Vektor hergestellt, die sowohl die vollständige cDNA von *mVITO-2* sowie 3' und 5' verkürzte Fragmente enthielten. Das 5' verkürzte Konstrukt enthielt wie bei VITO-1 keine Scalloped Interaktionsdomäne und diente ebenfalls zur Überprüfung der Spezifität der Bindungsreaktion und zum Nachweis der Notwendigkeit der SID für die TEF-Interaktion (Abbildung 22).

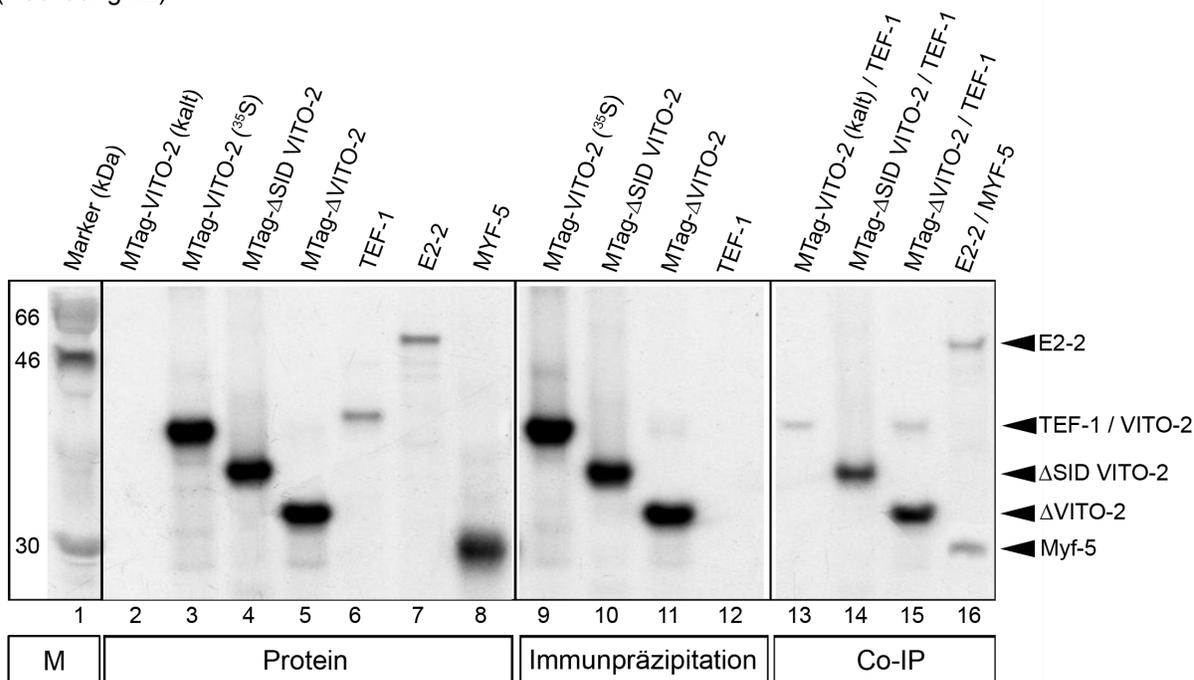


Abbildung 25. Zur Co-Immunopräzipitation von TEF-1 durch mVITO-2 wird die SID benötigt. Ausgangspunkt für diesen Versuch waren verschiedene mVITO-2/Myc-Tag Fusionsproteine (Bahnen 2-5), die mit TEF-1 (Bahn 6) durch einen Myc-Antikörper copräzipitiert wurden. Dabei zeigt sich, dass sowohl MTag-VITO-2 und MTag-ΔVITO-2 eine spezifische Bindung mit TEF-1 eingehen (Bahn 13 und 15), während das Fusionsprotein ohne SID kein TEF-1 copräzipitiert (Bahn 14). Zur Kontrolle wurden zuvor alle Proteine mit dem Myc-Antikörper präzipitiert (Bahnen 9 - 12), wobei keine unspezifische TEF Präzipitation beobachtet werden konnte. Als Positiv-Kontrolle wurden zusätzlich E2-2 und Myf5 mit einem E2-2 Antikörper präzipitiert (Bahn 16).

Die *in vitro* translatierten VITO-2 Fusionsproteine entsprachen den erwarteten Molekulargewichten von 45,2 kDa für MTag-VITO-2 mit der vollständigen cDNA (Abbildung 25, Bahn 3) sowie 33,4 kDa für das 5' verkürzte MTag- Δ SID VITO-2 ohne Scalloped Interaktionsdomäne (Abbildung 25, Bahn 4) und 27,2 kDa für das 3' verkürzte MTag- Δ VITO-2 (Abbildung 25, Bahn 5).

Die Co-Immunopräzipitation wurde für zwei Vertreter der TEF Genfamilie durchgeführt: für TEF-1 (Abbildung 25) sowie für TEF-3 (Abbildung 26). Zunächst erfolgte jeweils ein Kontrollversuch, in dem die verschiedenen VITO-2 Fusionsproteine (Abbildung 25 und Abbildung 26, Bahnen 9-11) sowie die TEFs (Abbildung 25 sowie Abbildung 26, Bahn 12) ausschließlich mit den Myc Antikörpern inkubiert wurden. Eine Präzipitation erfolgte dabei ausschließlich mit den VITO-2. Somit war gewährleistet, dass alle während der Co-Immunopräzipitation detektierten TEFs nur durch eine spezifische Interaktion mit den VITO-2 Proteinen präzipitiert werden konnten. Ähnlich der Co-Immunopräzipitation mit mVITO-1 konnte eine spezifische Interaktion nur mit TEF-1 nachgewiesen werden. Es zeigte sich hierbei, dass ähnlich zu mVITO-1, der Scalloped Interaktionsdomäne eine entscheidende Rolle bei der Protein-Protein Interaktion zwischen mVITO-2 und TEF-1 zukommt. Während die Fusionsproteine mit vollständiger bzw. 3' verkürzter cDNA eine Co-Immunopräzipitation mit TEF-1 zeigen (Abbildung 25, Bahnen 13 und 15), erfolgt beim MTag- Δ SID VITO-2 ohne SID keine spezifische Interaktion (Abbildung 25, Bahn 14). Verglichen zur mVITO-1/TEF-1 Interaktion ist die Bindung der beiden Proteine jedoch

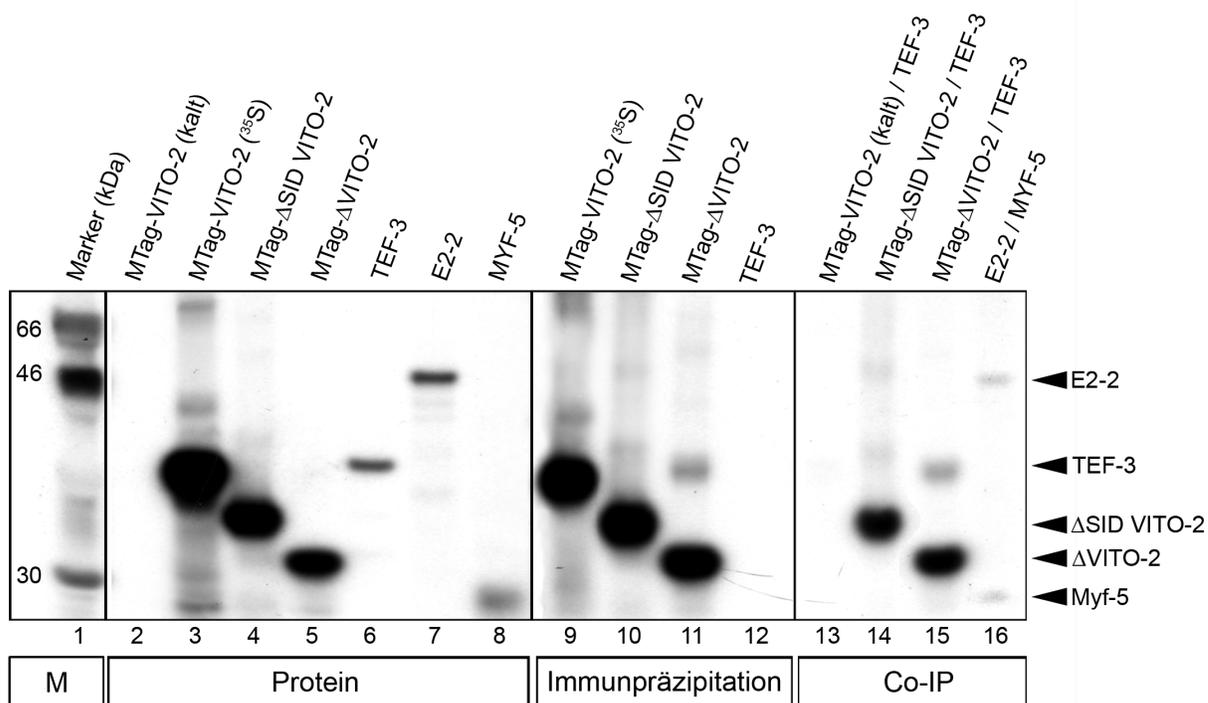


Abbildung 26. Autoradiographische Darstellung der Co-Immunopräzipitation von mVITO-2 mit TEF-3. Der Versuch wurde mit 3 verschiedenen Fusionsproteinen von mVITO-2 durchgeführt, wobei MTag-VITO-2 (Bahn 3) die vollständige cDNA beinhaltete, während MTag- Δ VITO-2 (Bahn 5) C-terminal und MTag- Δ SID VITO-2 (Bahn 4) N-terminal verkürzt waren. Als Positivkontrolle wurden E2-2 (Bahn 7) und Myf5 (Bahn 8) mittels eines E2-2 Antikörpers copräzipitiert (Bahn 16). Gegenüber der Positivkontrolle, konnte für keines der VITO-2 Fusionsproteine eine Co-Immunopräzipitation mit TEF-3 nachgewiesen werden (Bahnen 13-15).

schwächer (Vergleich Abbildung 23 und Abbildung 25, Bahnen 13 und 15). Zwar scheint in diesem Versuch auch die Menge an translatierten TEF-1 geringer zu sein, als in der vorangegangenen Co-Immunopräzipitation (siehe Abbildung 23 und Abbildung 25, Bahn 6), jedoch sind - gemessen an der Ausgangsmenge von TEF-1 - die Signale der präzipitierten Proteine deutlich schwächer. Im Falle von TEF-3 konnte mit keinem der VITO-2 Fusionsproteine eine spezifische Interaktion nachgewiesen werden (Abbildung 26, Bahnen 13 - 15). Zur Positivkontrolle wurde auch in diesen beiden Versuchen eine Co-Präzipitation mit Myf5 und E2-2 mit dem E2-2 Antikörper durchgeführt, die zu den erwarteten Ergebnissen führte (Abbildung 25 und Abbildung 26, Bahn 16).

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass auch für mVITO-2 eine spezifische Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor TEF-1 stattfindet. Dabei zeigte sich analog zu mVITO-1, dass die Scalloped Interaktionsdomäne bei dieser Interaktion eine wichtige Rolle spielt, da Fusionsproteine ohne SID keine Co-Präzipitation von TEF-1 zeigen. Zudem zeigt sich gegenüber mVITO-1 eine vergleichbar schwächere Co-Immunopräzipitation von TEF-1 durch mVITO-2, was auf eine mögliche alternative Funktion des Proteins hindeuten könnte. Auch im Falle des mVITO-2 konnte keine Bindung von TEF-3 mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation nachgewiesen werden und deutet gleichfalls auf eine hohe Selektivität des Proteins für bestimmte Interaktionspartner hin. Jedoch sei auch an dieser Stelle hingewiesen, dass in weiteren Versuchen auch ein Einfluss von TEF-3 auf bestimmte Eigenschaften von mVITO-2 nachgewiesen werden konnte (siehe 5.5.2. Die Interaktion von mVITO-2 mit TEF-1 und TEF-3 führt zur Erhöhung MCAT-abhängiger Reporter). Hieraus könnte die Schlussfolgerung abgeleitet werden, dass *in vivo* noch weitere Proteine die Interaktion von mVITO-1/2 und TEF-1/3 beeinflussen.

5.4.4. Nachweis der TEF-1 Interaktion mittels überexprimierter Proteine aus HEK293 Zellen

Zusätzlich zur Co-Immunopräzipitation mit den *in vitro* translatierten TEF- und VITO-Proteinen wurde auch ein Versuch mit in HEK293 Zellen überexprimierten Proteinen durchgeführt. Dieser Versuch sollte einen weiteren Nachweis der spezifischen VITO/TEF-1 Interaktion erbringen und außerdem mögliche, für die Interaktion notwendige, Proteinmodifikationen gewährleisten oder zusätzlich benötigte Interaktionspartner zur Verfügung stellen. Zudem lässt sich anhand der Signalstärken abschätzen, wie die ungefähre stöchiometrische Verteilung der Proteine bei der Komplexbildung ist. Für den Versuch wurden die Expressionskonstrukte aus den vorangegangenen Experimenten mittels Kalziumphosphat-Copräzipitation in HEK293 Zellen transfiziert und die Zellen nach 48 h lysiert. Die Immunopräzipitation sowie die Detektion der Proteine im Western-Blot erfolgte jeweils mit dem TEF-1 und Myc-Antikörper.

Für den Versuch wurden jeweils 4 verschiedene Ansätze transfiziert. Je eine Transfektion erfolgte mit einem der Proteine und pKS als Mengenausgleich. Zusätzlich erfolgte eine Co-Transfektion mit TEF-1 und VITO-1 bzw. VITO-2 und als Kontrolle ein Ansatz ohne eines der Expressionskonstrukte. Nach Bestimmung der Gesamtproteinmenge wurden jeweils 500µg Protein für die Immunopräzipitation eingesetzt und nach erfolgter Immun-Präzipitation je 10µg von den einzelnen Präzipitationsschritten

(Lysat, Überstand der Präzipitation, Präzipitat) auf ein SDS-Acrylamid-Gel aufgetragen. Die

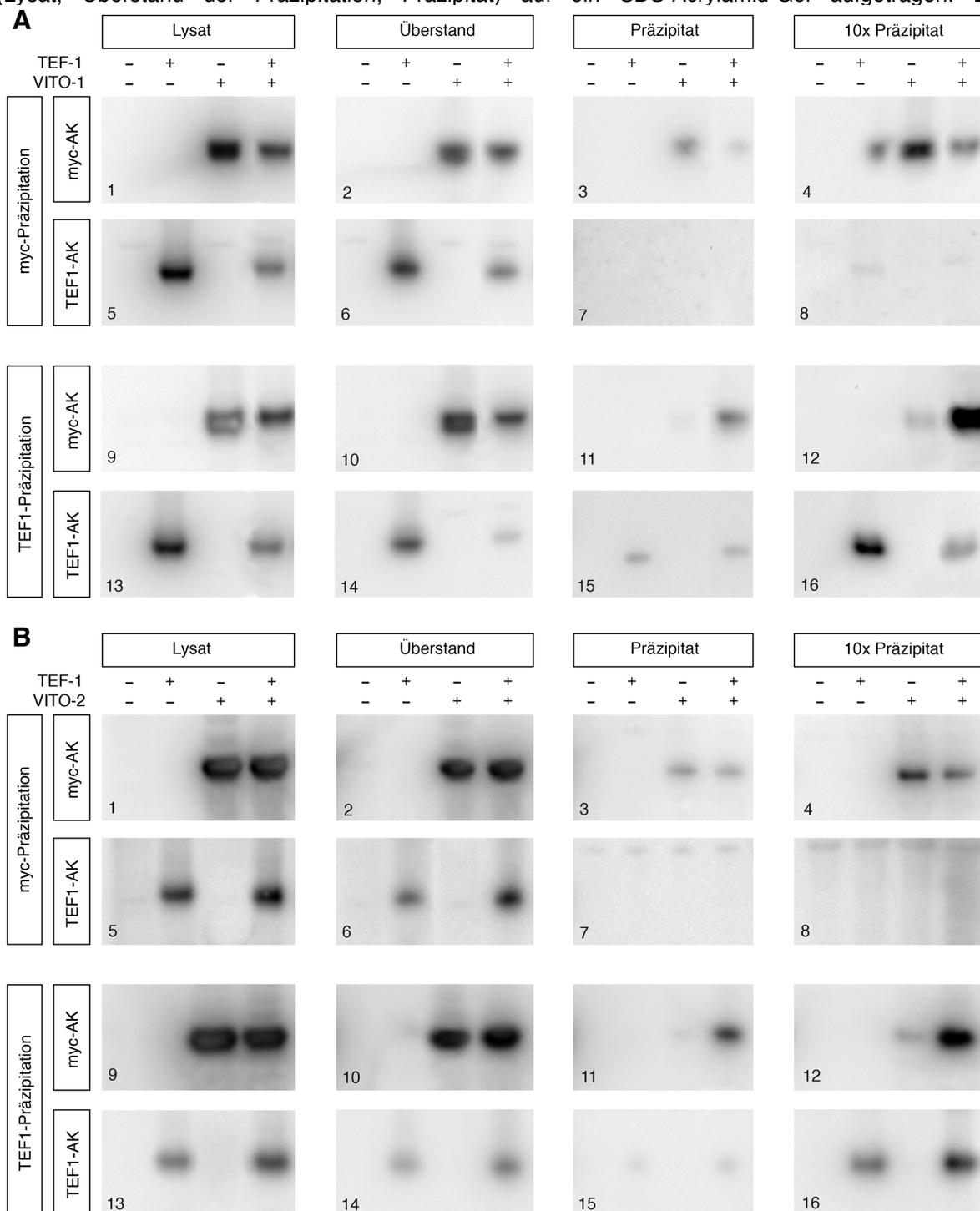


Abbildung 27. Co-Immunopräzipitation von TEF-1 mit mVITO-1 (A) und mVITO-2 (B) mit Hilfe von überexprimierten Proteinen. Es wurden 4 verschiedene Transfektionsansätze verwendet, in denen jeweils VITO und/oder TEF-1 überexprimiert wurden; sowie ein Kontrollansatz in dem statt der Expressionskonstrukte nur pKS transfiziert wurde. Die Immunopräzipitation und Protein-Detektion erfolgte jeweils mit dem TEF-1 und dem Myc-Antikörper. Neben den erwarteten Banden bei Präzipitation und Detektion mit dem gleichen Antikörper (A1-A4; A13-A16; B1-B4; B13-B16) sind auch Signale sichtbar, die nur aus einer Co-Präzipitation resultieren können (A8; A11; A12; B11 und B12). Jedoch konnte eine spezifische Interaktion nur nach Co-Präzipitation der beiden VITO Proteine durch TEF-1 und seinem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (A11; A12; B11 und B12). Dabei

zeigt sich bei alleiniger Überexpression der VITO Proteine zunächst nur ein schwaches Signal, das vermutlich auf eine Präzipitation mit endogenem TEF-1 zurückzuführen ist (A11; A12; B11 und B12; jeweils Bahn 3). Nach der gemeinsamen Überexpression beider Proteine zeigt sich jedoch ein deutlich stärkeres Signal, was auf eine spezifische Interaktion von VITO und TEF-1 hindeutet. Bei der Co-Präzipitation von mVITO-1 mit dem Myc-Antikörper zeigt sich lediglich ein schwaches TEF-1 Signal im 10fach aufkonzentrierten Präzipitat (A8). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass eine Interaktion beider Proteine nicht in äquimolaren Mengen erfolgt, sondern TEF-1 mehrere VITO Proteine binden und präzipitieren kann und im umgekehrten Falle mehre VITO Proteine zur Bindung und Präzipitation von einem TEF-1 nötig sind.

Proteinmengen der einzelnen Schritte wurden aus dem Verhältnis von eingesetzter Proteinmenge und Gesamtvolumen der Präzipitationsschritte berechnet und stellen somit nur ungefähre Werte dar. Diese sind aber notwendig, um annähernd gleiche Proteinmengen auf das Gel aufzutragen und um die Effizienz der Co-Immunopräzipitation abzuschätzen. Da nur ein geringer Teil der eingesetzten Proteine präzipitiert wird, wurde zusätzlich ein 10fach konzentriertes Präzipitat eingesetzt, das verglichen zur Ausgangsmenge ca. 1/5 der Gesamtproteine entspricht. Das Proteingel wurde anschließend geblottet und die Proteine mit dem TEF-1 bzw. Myc-Antikörper detektiert.

Wie erwartet, zeigten sich nach der Überexpression sowie Präzipitation und Detektion mit dem entsprechenden Antikörper, wie z.B. für mVITO-2 mit dem Myc-Antikörper in Abbildung 27 (B1 bis B4, jeweils Bahn 3 und 4) deutliche Signale der Proteine in den Lysaten. Es ist zudem deutlich erkennbar, dass nur ein geringer Teil der überexprimierten Proteine durch die Antikörper präzipitiert wird, da die Signale im Präzipitat und sogar im 10fach konzentrierten Präzipitat eindeutig schwächer sind. Dies ist vermutlich auf die begrenzte „Präzipitationskapazität“ der Antikörper und der Sepharose zurückzuführen. Interessanter sind jedoch die Beobachtungen, die durch den Einsatz unterschiedlicher Antikörper für Präzipitation und Western Blot gemacht werden können. So lassen sich nach Präzipitation mit dem TEF-1 Antikörper und Detektion durch den Myc-Antikörper ebenfalls VITO Proteine nachweisen (Abbildung 27, A11 und A12, B11 und B12). Da sowohl die Präzipitation als auch die Detektion durch die Antikörper spezifisch sind (siehe auch Abbildung 23 und Abbildung 25), können diese Signale nur durch eine Interaktion und Co-Präzipitation mit TEF-1 erzeugt werden. Gegenüber den Präzipitaten mit ausschließlicher Überexpression von VITO-1/2 zeigt sich zudem ein deutlich stärkeres Signal nach Überexpression beider Proteine. Die schwache VITO-Bande entsteht vermutlich durch Präzipitation mit endogen exprimiertem TEF-1, während das eindeutig stärkere Signal durch Präzipitation mit dem überexprimierten TEF-1 erfolgt und somit ein Nachweis für die spezifische Interaktion zwischen TEF-1 und VITO-1 bzw. VITO-2 ist. Im Gegensatz dazu, ist nach einer Präzipitation mit dem Myc- und Detektion mit dem TEF-1 Antikörper nur ein sehr schwaches Signal bei der Co-Präzipitation mit VITO-1 zu sehen (Abbildung 27, A8). Da die Präzipitation durch den Myc-Antikörper jedoch eindeutig funktioniert (Abbildung 27, A1 bis A4, bzw. B1 bis B4) und auch ein Nachweis mit dem TEF-1 Antikörper nicht beeinträchtigt ist (Abbildung 27, B5, B6), muss diese Beobachtung auf eine nicht-äquimolare Interaktion der Proteine zurückzuführen sein.

Zusammenfassend lässt sich durch die Co-Immunopräzipitation mit überexprimierten TEF-1 und VITO Proteinen ebenfalls eine spezifische Interaktion nachweisen. Die Tatsache, dass die Interaktion der

Proteine fast ausschließlich durch Co-Präzipitation von VITO durch TEF-1 nachgewiesen werden konnte, legt die Vermutung nahe, dass die Komplexbildung nicht in äquimolaren Verhältnissen abläuft. Ob dies der physiologischen Situation entspricht oder ein Artefakt der experimentellen Situation (Überexpression, Verwendung heterologer Zellen) geschuldet ist, lässt sich zur Zeit jedoch nicht abschließend bewerten.

5.5. Die Interaktion der TEFs mit den VITO Proteinen führt zur Transaktivierung MCAT-abhängiger Reporter *in vivo*

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass sowohl mVITO-1 und mVITO-2 mit TEF-1 *in vitro* interagieren können, sollte die funktionelle Rolle der Proteininteraktion *in vivo* mit Hilfe von Transaktivierungsversuchen nachgewiesen werden.

Da TEF-1 - trotz seiner erwiesenen Funktion als Transkriptionsfaktor - nicht befähigt ist, nach epitopischer Expression TEF-abhängige Reporter zu aktivieren, wird postuliert, dass für die TEF-abhängige Transaktivierung weitere Faktoren notwendig sind. Diese werden als Co-Aktivatoren oder TIFs (T_ranskriptions I_ntermediär F_aktoren) bezeichnet und konnten bereits für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Ein weiteres Argument für die Existenz der Cofaktoren ist die Tatsache, dass TEF-1 trotz seiner nahezu ubiquitären Expression für sehr spezifische Entwicklungsprozesse verantwortlich ist und somit die Aktivität des TEF-1 durch einen anderen - spezifisch exprimierten - Faktor kontrolliert werden muss. Da die *in vitro* Interaktion mit mVITO-1 und mVITO-2 bereits nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass die VITO-Proteine potentielle Co-Aktivatoren von TEF-1 sind und nach Komplexbildung MCAT-abhängige Gene transaktivieren können.

Die Versuche zur Untersuchung des Transaktivierungspotentials von mVITO-1 wurden sowohl in mVITO-1 exprimierenden Zelllinien (C₂C₁₂) sowie in eukaryotischen Zellen ohne endogene Expression (HEK293) durchgeführt. Da sich die Transfektion der HEK293 Zelllinie als effektiver erwies, wurden zur Untersuchung von mVITO-2 ausschließlich diese Zellen verwendet. Dafür wurden hier - zur zusätzlichen Untersuchung der Rolle der SID für die Transaktivierung - die verschiedenen Expressionskonstrukte von mVITO-2 aus den vorangegangenen Experimenten verwendet, welche entweder keine SID enthalten oder am C-terminalen Ende verkürzt sind. Als Reporter für die MCAT-abhängige Transaktivierung wurde der Vektor *pTA-Luc* verwendet, der neben einem basalen Promoter (P_{TAL}) und einer nachfolgenden multiplen Klonierungsstelle, das eigentliche Reporterogen (Luciferase) enthält. In die multiple Klonierungsstelle wurden sowohl eine einfache sowie eine 4-fache Kopie einer MCAT Bindungssequenz (CATTCCA) aus dem Promoter des Gens für die schwere Kette des β -Myosins verschiedener Spezies kloniert. Durch Co-Transfektion dieses Reporterkonstruktes mit TEFs und potentiellen Cofaktoren, können diese auf einen möglichen transkriptionsaktivierenden bzw. - reprimierenden Einfluss auf MCAT-abhängige Promotoren untersucht werden. Dabei ist die Menge

an

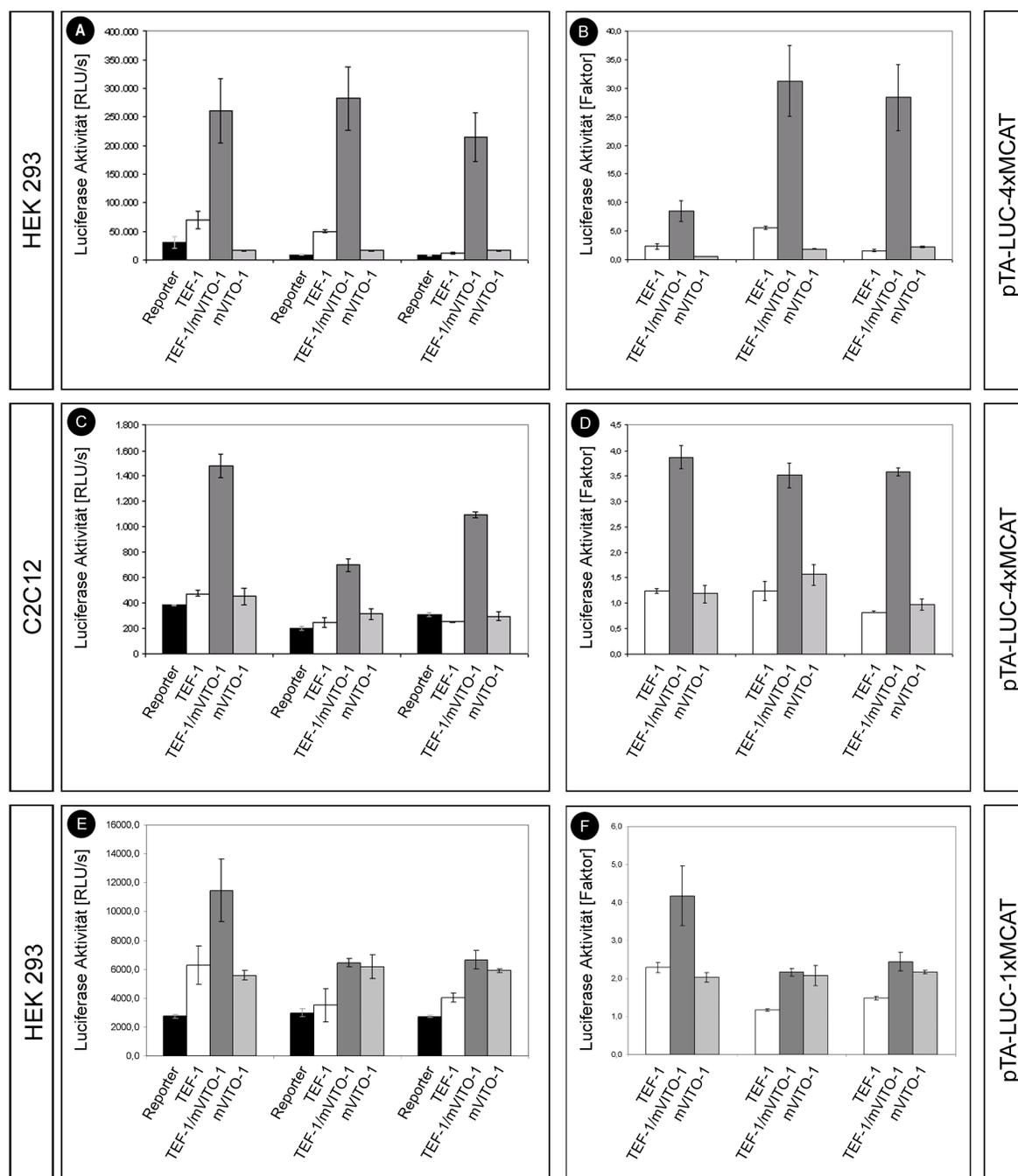


Abbildung 28. Die Co-Transfektion von mVITO-1 und TEF-1 führt zu einer Transaktivierung MCAT abhängiger Reporter in HEK293 Zellen (A, B, E und F) und in der Myoblasten-Zelllinie C₂C₁₂ (C und D). Nach Transfektion von TEF-1 und/oder mVITO-1 sowie einem Reporterkonstrukt mit einer einzelnen MCAT-Sequenz (E und F) oder 4fach wiederholten Motiven (A-D), wurden die Zellen nach 48stündiger Inkubation geerntet und eine Luciferase-Messung durchgeführt. Pro Versuchsansatz wurden jeweils 3 Experimente mit jeweilig 5 unabhängigen Transfektionen durchgeführt. Die gemessenen absoluten Luciferase-Werte wurden jeweils im linken Diagramm (A, C, und E) dargestellt, wogegen in den rechten Diagrammen der Grad der Aktivierung, errechnet aus dem Verhältnis von basaler und gemessener Aktivität, veranschaulicht wird (B, D und E). Während die Überexpression von mVITO-1 und TEF-1 allein in allen Versuchen zu keiner Steigerung der Reporteraktivität führt, ist die Menge an gemessener Luciferase nach

Co-Transfektion um bis zu 32fach erhöht (B) und demonstriert somit die Transaktivierung MCAT-abhängiger Promoter durch den TEF-1/VITO-1 Komplex.

gebildeter Luciferase proportional zur Transaktivierung des Promotors und kann durch einen einfachen chemischen Nachweis gemessen werden.

5.5.1. Zur Transaktivierung MCAT-abhängiger Reporter durch TEF-1 wird mVITO-1 benötigt

Wie in Abbildung 28 erkennbar ist, können weder das mVITO-1 noch das TEF-1 allein die pTA-Luc-MCAT-Reporterkonstrukte in einem der verwendeten Zelltypen aktivieren. Dies deckt sich im Falle des TEF-1 mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Chaudhary *et al.*, 1994), da eine Überexpression von TEF-1 in einer Repression von MCAT-abhängigen Reportern durch fehlende Cofaktoren resultiert. Nach der Überexpression von mVITO-1 sollte es ebenfalls zu keiner Aktivierung kommen, da die Sequenz der VITO Proteine keinen Hinweis auf eine DNA-Bindedomäne gibt. Nach Co-Transfektion von mVITO-1 und TEF-1 ist jedoch ein deutlicher Anstieg der Aktivität des Reporterkonstrukts pTA-Luc-4xMCAT mit der vierfach wiederholten Sequenz des MCAT Motivs messbar. In den HEK293 Zellen ist die Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Basalaktivität (alleinige Transfektion des Reporterkonstrukts) zwischen 8fach und 32fach erhöht (Abbildung 28C). Aufgrund einer deutlich geringeren Transfektionseffizienz und eines höheren basalen Hintergrunds in der C₂C₁₂ Zelllinie, ist der Anstieg der Reporteraktivität nach Co-Transfektion der beiden Faktoren hier nicht ganz so deutlich, führt im Durchschnitt aber dennoch zu einer ca. 3,5fachen Erhöhung der Luciferase-Werte (Abbildung 28D). Um zu untersuchen, ob die Transaktivierung durch den mVITO-1/TEF-1 Komplex von der Anzahl der MCAT Motive abhängig ist, wurden die Transfektionen auch mit dem pTA-Luc-1xMCAT Reporter durchgeführt, welcher nur ein einzelnes MCAT-Bindemotiv enthielt. Hier zeigt sich nach Transfektion in den HEK293 Zellen nur eine sehr schwache Aktivierung des Reporters mit maximal 4fach erhöhten Luciferase-Werten (Abbildung 28F, 1. Gruppe). Durch die vergleichsweise hohe Hintergrundaktivität, die geringeren absoluten Luciferase-Werte und deren weite Streuung, ist es in diesem Versuchsansatz schwierig, eindeutige Aussagen zu treffen. In einer der Versuchsgruppen ist sogar die Aktivierung durch das mVITO-1 allein annähernd so stark, wie nach der Co-Transfektion mit TEF-1 (Abbildung 28F, 2. Gruppe).

Als Ergebnis der Versuche lässt sich feststellen, dass die Interaktion von mVITO-1 und TEF-1 eine deutliche Transaktivierung MCAT-abhängiger Reporter in Myoblastenzellen der Maus und humanen embryonalen Nierenzellen bewirkt. Die Stärke der Transaktivierung hängt dabei von der Anzahl der MCAT Motive innerhalb des Promotors ab, da einzelne MCAT Sequenzen nur zu einem geringfügigen Anstieg führen, während der Reporter mit der 4fachen MCAT-Kopie 10mal stärker aktiviert wird. In vorangegangenen Untersuchungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in vergleichbaren Versuchen mit TEF-3, das ebenfalls im Skelettmuskel exprimiert wird, keine solche Aktivierung messbar ist. Daraus lässt sich schließen, dass mVITO-1 exklusiv mit TEF-1 einen Transaktivierungs-Komplex bildet, der Promotoren mit mehreren MCAT Motiven aktivieren kann.

5.5.2. Die Interaktion von mVITO-2 mit TEF-1 und TEF-3 führt zur Aktivierung MCAT-abhängiger Reporter

Die Transaktivierungsversuche mit mVITO-2 wurden entsprechend den vorangegangenen Versuchen durchgeführt (3 Versuchsansätze mit je 5 unabhängigen Transfektionen), jedoch wurde hier nur die HEK293 Zelllinie verwendet, da die hohe Hintergrundaktivität und niedrige Transfektionsrate in den C₂C₁₂ Zellen nur zu ungenauen und nicht reproduzierbaren Ergebnissen führte. Im Gegensatz zu den Versuchen mit mVITO-1 wurden hier auch die *mVITO-2* Expressionskonstrukte mit den verschiedenen cDNA Deletionen verwendet, um den Einfluss der Scalloped Interaktionsdomäne auf die Fähigkeit zur Transaktivierung der MCAT Reporter zu verdeutlichen.

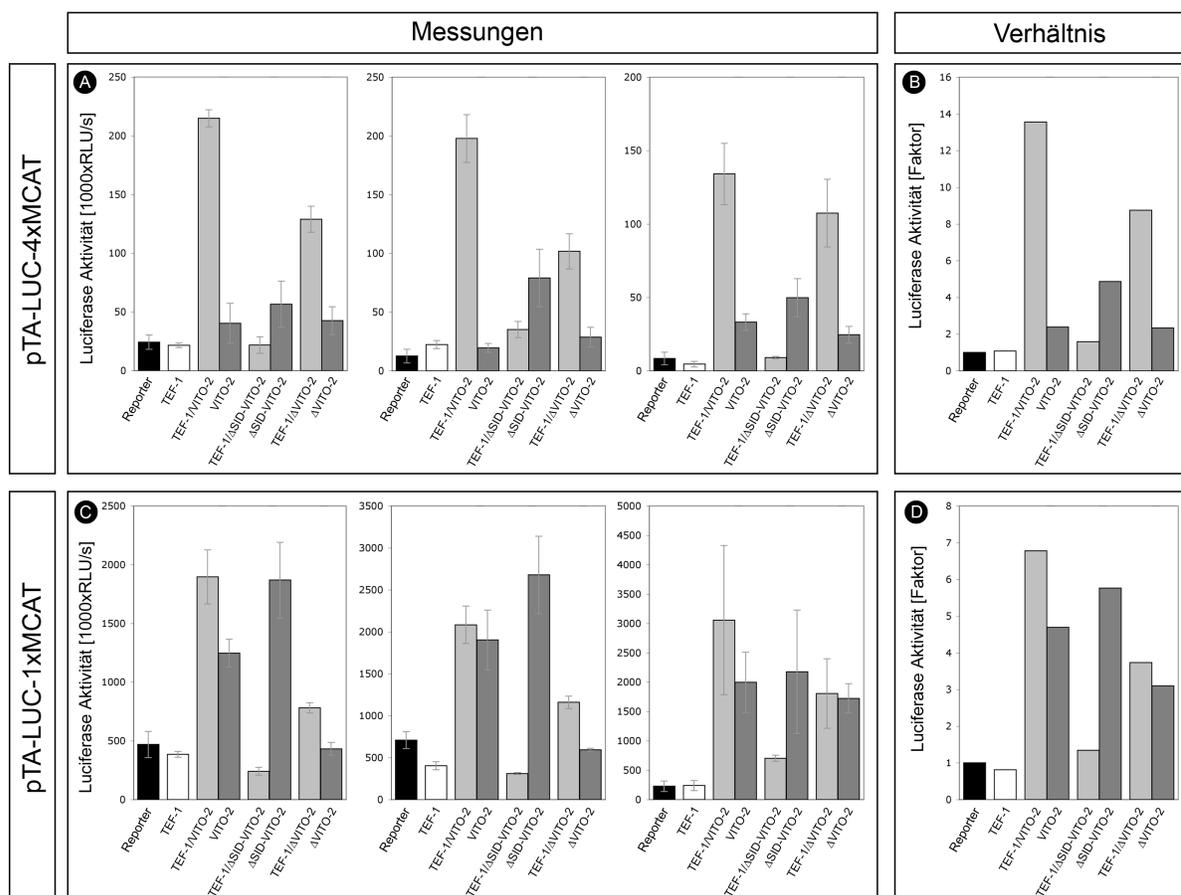


Abbildung 29. Transaktivierung MCAT abhängiger Luciferase-Reporter durch mVITO-2 und TEF-1 in HEK293 Zellen. Die Versuche wurden jeweils mit einem Luciferase-Reporter mit einer einzelnen MCAT Sequenz (C und D) sowie mit einer 4fachen Wiederholung des Motivs (A und B) durchgeführt. Jeder der 3 Versuchsansätze beinhaltete 5 unabhängige Transfektionen, deren absolute Luciferase-Werte in den linken Diagrammen (A und C) und der durchschnittliche relative Anstieg der Aktivierung im jeweils rechten Diagramm (B und D) dargestellt wurde. Die Überexpression von TEF-1 allein führte zu keiner Aktivierung. Erst nach Co-Transfektion mit den mVITO-2 Konstrukten, welche die SID enthielten, war eine 13fache bzw. 8fache Steigerung der Luciferase-Aktivität mit dem pTA-Luc-4xMCAT messbar (B). In den Messungen mit dem pTA-Luc-1xMCAT Reporter war die Aktivierung um die Hälfte schwächer und betrug ca. das 7fache bzw. 4fache der Hintergrundaktivität (D).

Ähnlich wie bei mVITO-1 führt eine alleinige Transfektion von TEF-1 in keinem der Versuche zu einer Aktivierung des Luciferase Reporters (Abbildung 29). Im Gegensatz zu den Versuchen mit mVITO-1 zeigt hier die Transfektion der mVITO-2 Expressionskonstrukte - besonders in den Versuchen mit dem pTA-Luc-1xMCAT Reporter - bereits einen deutlichen Anstieg der Luciferase-Werte (Abbildung 29D). Jedoch findet sich in fast allen Experimenten ein noch stärkerer Anstieg der Reporter-Aktivität, nachdem TEF-1 cotransfiziert wurde. Eine Ausnahme bildet ausschließlich das Δ SID-VITO-2 Konstrukt, das keine Scalloped Interaktionsdomäne enthält und nach Co-Transfektion mit TEF-1 deutlich niedrigere Werte im Bereich der Hintergrundaktivität zeigt. Diese Beobachtung beweist, dass die gemessenen Veränderungen in der Luciferaseaktivität spezifisch sind und bestätigt

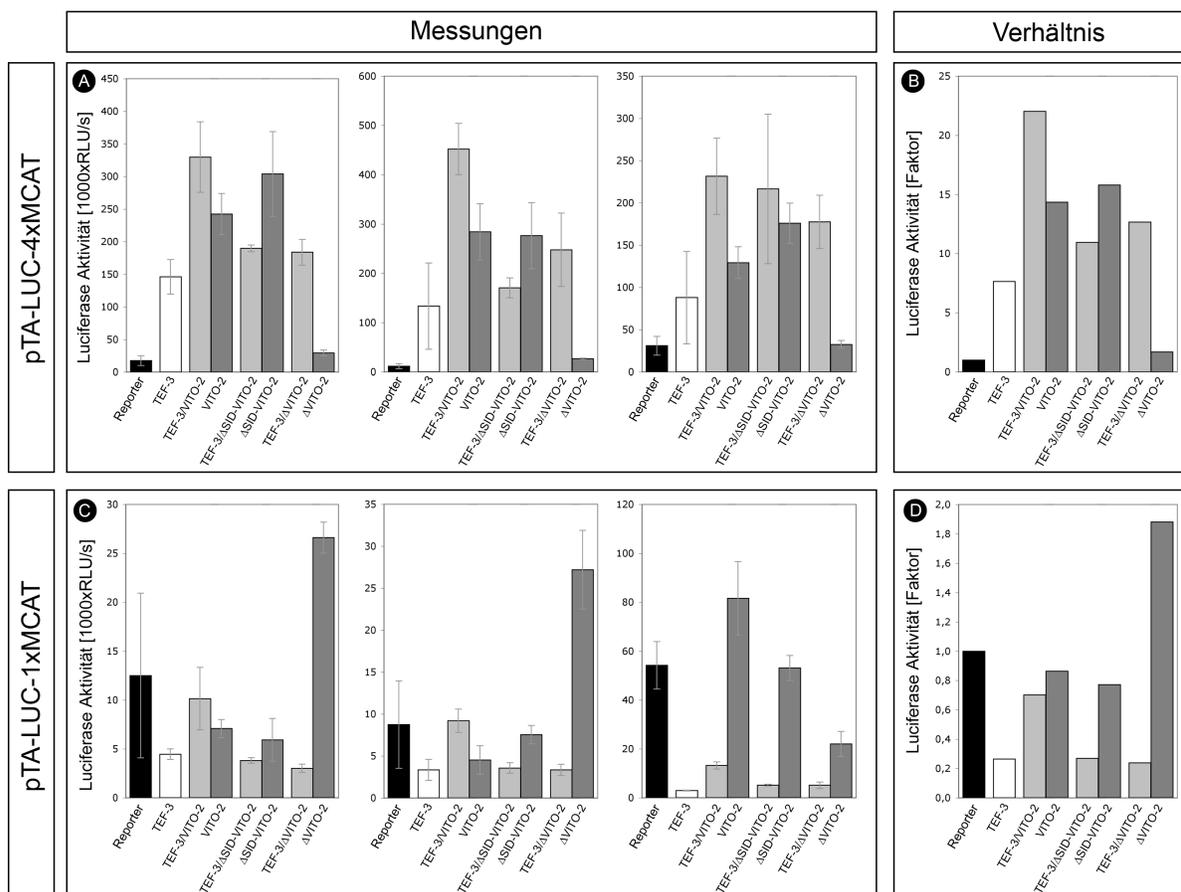


Abbildung 30. Die Co-Transfektion von mVITO-2 mit TEF-3 führt nur zu einer geringfügigen Transaktivierung TEF-abhängiger Reporter in HEK293 Zellen. Je 3 Versuchsgruppen mit 5 unabhängigen Transfektionen von TEF-3 und/oder mVITO-2 sowie dem pTA-Luc-4xMCAT (A und B) bzw. pTA-Luc-1xMCAT (C und D) wurden durchgeführt und die gemessenen absoluten Luciferase-Werte in den linken Diagrammen dargestellt (A und C). Aus dem Verhältnis von gemessenen Werten und der basalen Aktivität der entsprechenden Reporter wurde ebenfalls die durchschnittliche Stärke der Transaktivierung errechnet und in einem weiteren Diagramm abgebildet (B und D). Der pTA-Luc-4xMCAT Reporter wird bereits durch die Transfektion von TEF-3 bzw. der verschiedenen mVITO-2 Konstrukte aktiviert, erfährt jedoch noch einen weiteren Anstieg der Luciferasemenge nach Co-Transfektion beider Faktoren, wobei der größte Anstieg beim C-terminal verkürzten mVITO-2 zu verzeichnen ist (B). Bei Verwendung des Luciferase Reporters mit dem

einzelnen MCAT Motiv konnte hingegen keine eindeutige Transaktivierung festgestellt werden (C und D).

erneut die vorangegangenen Ergebnisse, wonach eine VITO/TEF Interaktion nur beim Vorhandensein der SID erfolgt. Im Vergleich zu mVITO-1 ist die Transaktivierung jedoch nicht ganz so stark und beträgt durchschnittlich ca. das 13fache der Basalaktivität des pTA-Luc-4xMCAT Reporters (Abbildung 29B). Wie bei den Versuchen mit mVITO-1, ist auch bei mVITO-2 der Anstieg der Luciferase-Werte nach der Co-Transfektion deutlich niedriger, wenn der Reporter mit dem einzelnen MCAT-Motiv verwendet wird. Die gemessene Transaktivierung beträgt hier nur ca. das 4fache der Basalaktivität (Abbildung 29D), wobei die Streuung der einzelnen Messwerte sehr groß ist und die Unterschiede somit oft außerhalb der Signifikanzgrenzen liegen (Abbildung 29C, Gruppe 2 und 3). Wie bereits erwähnt, bleibt eine Transaktivierung der mVITO-2 Konstrukte ohne SID zusammen mit TEF-1 in beiden Versuchsansätzen völlig aus. Darüber hinaus ist auch eine Verringerung der Luciferase-Aktivität nach Transfektion des C-terminal verkürzten mVITO-2 zu beobachten, wobei die Werte hier ca. der Hälfte der Aktivierung des vollständigen mVITO-2 entsprechen. Dies ist beim pTA-Luc-4xMCAT ca. die 8fache Menge (Abbildung 29B) und beim pTA-Luc-1xMCAT ca. die 3,5fache Menge an Luciferase (Abbildung 29D).

Im Gegensatz zu mVITO-1 ist im Falle des mVITO-2 auch eine schwache Transaktivierung des pTA-Luc-4xMCAT Reporters nach Co-Transfektion mit TEF-3 zu beobachten (Abbildung 30). Zwar zeigt - mit Ausnahme vom C-terminal verkürzten Δ VITO-2 - bereits die Transfektion der mVITO-2 Expressionskonstrukte eine Aktivierung des Reporters um das 15fache; jedoch wird auch hier die Reporteraktivität nach Co-Transfektion mit TEF-3 noch einmal gesteigert (Abbildung 30B). Dieser zusätzliche Anstieg beschränkt sich jedoch nur auf die Expressionskonstrukte, welche die Scalloped Interaktionsdomäne besitzen. Die Co-Transfektion des mVITO-2 Konstrukts ohne SID (Δ SID-VITO-2) zusammen mit TEF-3 zeigt hingegen eine Abnahme der Reporteraktivität, was die Spezifität der anderen Ergebnisse unterstreicht. Erstaunlicherweise scheint das C-terminal verkürzte mVITO-2 allein nur ein sehr geringes Transaktivierungspotential zu besitzen (ca. 2fach), während nach Co-Transfektion mit TEF-3 die gemessene Luciferasemenge dem 12fachen der Hintergrundaktivität entspricht. Dies ist in diesem Versuchsansatz zwar die größte Differenz der Reporteraktivität zwischen alleiniger Transfektion von mVITO-2 und Co-Transfektion mit TEF-3, jedoch ist die Stärke der Transaktivierung immer noch deutlich niedriger, als die 22fache Aktivierung nach der Co-Transfektion des vollständigen mVITO-2 mit TEF-3 (Abbildung 30B). Ob diese Beobachtung nur auf die außergewöhnlich niedrigen Luciferasemengen nach Transfektion von Δ VITO-2 zurückzuführen ist, oder tatsächlich eine stärkere Transaktivierung des pTA-Luc-4xMCAT Reporters durch das C-terminal verkürzte mVITO-2 zusammen mit TEF-3 erfolgt, bleibt fraglich, zumal das Verhältnis der Transaktivierung zwischen mVITO-2/TEF-3 und Δ VITO-2/TEF-3 mit dem zwischen mVITO-2/TEF-1 und Δ VITO-2/TEF-1 nahezu identisch ist (Vergleich Abbildung 29B und Abbildung 30B). Im Vergleich zu den Beobachtungen mit dem pTA-Luc-4xMCAT Konstrukt, zeigt der Reporter mit nur einem MCAT

Motiv keine Transaktivierung nach Co-Transfektion von TEF-3 mit einem der mVITO-2 Expressionskonstrukte (Abbildung 30C und D). Nur nach alleiniger Transfektion des Δ VITO-2 Konstrukts zeigt sich ein maximal 1,8facher Anstieg der Reporteraktivität gegenüber dem Hintergrund. Zusammenfassend konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass mVITO-2 mit den beiden untersuchten Transkriptionsfaktoren TEF-1 und TEF-3 MCAT-abhängige Reporter aktivieren kann. Während nach Co-Transfektion von mVITO-2 mit TEF-3 die Transaktivierung ausschließlich mit dem pTA-Luc-4xMCAT Konstrukt messbar ist, erfolgt mit TEF-1 bei beiden verwendeten Reportern eine Aktivierung des Luciferasegens, die sich lediglich in der Stärke unterscheidet, jedoch nicht im Verhältnis der verschiedenen mVITO-2 Expressionskonstrukte zueinander. Wie in den vorangehenden Versuchen erfolgte bei den VITO Konstrukten ohne die SID weder mit TEF-1 noch mit TEF-3 eine Transaktivierung vermutlich als Folge der fehlenden Interaktion. Diese Beobachtungen zeigen erneut die Wichtigkeit der Scalloped Interaktionsdomäne für die Interaktion mit TEF-1 und TEF-3 und weisen gleichzeitig auf eine mögliche biologische Funktion des VITO/TEF Komplexes hin, nämlich der transkriptionellen Aktivierung TEF-abhängiger Gene unter der Kontrolle von mVITO-1 und mVITO-2.

5.6. Die VITO Proteine ändern die DNA Bindeeigenschaften der TEFs *in vitro*

Da mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation *in vitro* und den Transaktivierungsversuchen *in vivo* eine Interaktion zwischen den VITO Proteinen und TEF-1 nachgewiesen werden konnte und darüber hinaus auch eine Stimulation MCAT-abhängiger Reporterstrukture durch den VITO/TEF-1 Komplex erfolgte, sollte in weiteren Versuchen geklärt werden, ob aus der Interaktion der beiden Proteine eine Veränderung der TEF-1 DNA-Bindedomäne resultiert, welche die vorherigen Beobachtungen erklärt. Gestützt wurde diese Vermutung durch die Arbeiten von G. Halder und S.B. Carroll, die im Vorfeld zeigen konnten, dass die Bindung des *Drosophila* Cofaktors Vestigial an das TEF-Homolog Scalloped die DNA-Bindeeigenschaften dieses Enzyms verändert (Halder und Carroll, 2001).

Für die Untersuchungen der DNA-Bindeeigenschaften von TEF-1 wurde eine Gel-Retentions-Analyse durchgeführt, die auch als EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) bezeichnet wird. Diese beruht im Wesentlichen auf der Elektrophorese eines Protein/DNA Gemisches in einem nativen Poly-Acylamid-Gel, wobei die verwendeten DNA-Fragmente MCAT Motive enthalten und radioaktiv markiert sind. Spezifische Protein/DNA Komplexe bleiben während der Elektrophorese erhalten und können autoradiographisch detektiert und quantitative Unterschiede festgestellt werden. Zudem erlaubt die detektierte Größe der Protein/DNA Komplexe Rückschlüsse auf eine mögliche Polymerisierung der Proteine zu ziehen.

5.6.1. Die *in vitro* Interaktion von mVITO-1 mit den TEF-1 verringert die Bindung an isolierte MCAT Motive

Zur Untersuchung der DNA-Bindeeigenschaften von TEF-1 wurden EMSAs mit oder ohne mVITO-1

durchgeführt, wobei vom gesamten Translationsansatz von mVITO-1 jeweils $2\mu\text{l}$ und von TEF-1 je $4\mu\text{l}$ eingesetzt wurden, um äquimolare Mengen der Proteine zu erhalten (Abbildung 31A). Zudem wurden drei verschiedene Oligonukleotide (*Bs01*, *Bs02*, *Bs03*) verwendet, die in den Promoter- bzw. Enhancerregionen verschiedener muskelspezifischer Gene unterschiedlicher Spezies identifiziert werden konnten (Larkin und Ordahl, 1999). Es ist eine deutliche Komplex-Formation von TEF-1 mit

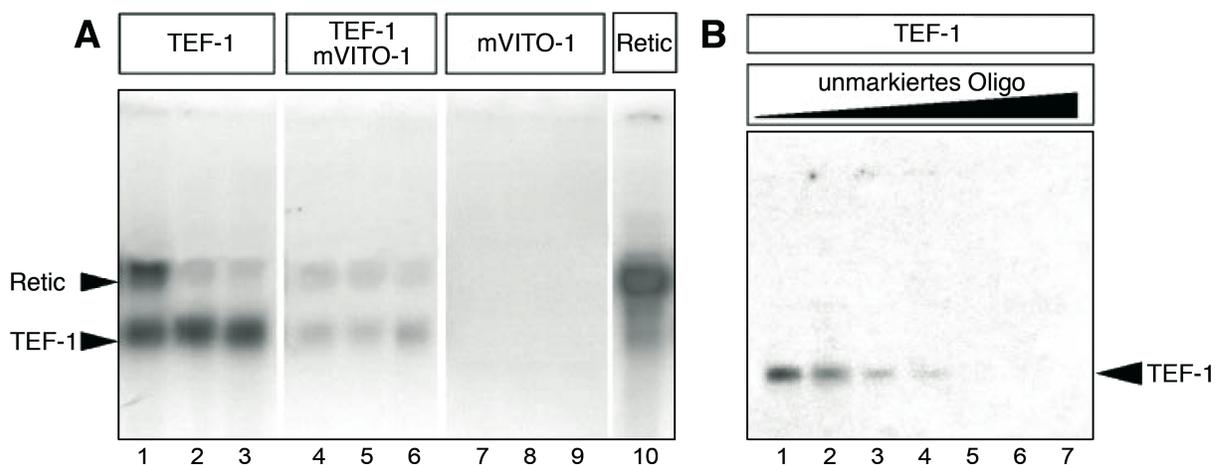


Abbildung 31. DNA-Bindung von TEF-1 und mVITO-1 an verschiedene MCAT DNA Motive. (A) Äquimolare Mengen an *in vitro* translatierten TEF-1 (Bahn 1-3), mVITO-1 (Bahn 7-9) sowie beiden Proteinen (Bahn 4-6) wurden jeweils mit den doppelsträngigen Oligonukleotiden *Bs01* (Bahnen 1, 4, 7 und 10), *Bs02* (Bahnen 2, 5 und 8) sowie *Bs03* (Bahnen 3, 6 und 9) inkubiert und aufgetragen. Neben einer unspezifischen Bande (Retic), die hauptsächlich mit dem *Bs01* Oligo detektiert wurde und von Resten des Retikulozytenlysats stammt, ist ein weiterer TEF-1 spezifischer Komplex (TEF-1) erkennbar. Dieser Komplex wird nicht mit mVITO-1 geformt (Bahn 7-8) und ist deutlich schwächer nach Inkubation beider Proteine (Bahn 4-6). (B) Um die Spezifität der Ergebnisse zu überprüfen, wurde ein Kompetitions-EMSA zwischen markierten *Bs01* und ansteigenden Konzentrationen von unmarkierten Oligo (Bahn 1, 0ng; Bahn 2, 25ng; Bahn 3, 250ng; Bahn 4, 500ng; Bahn 5, 1250ng; Bahn 6, 2500ng; Bahn 7, 5000ng) durchgeführt.

den verschiedenen MCAT-Oligos zu beobachten (Abbildung 31A, Bahn1-3), die nach zusätzlicher Inkubation mit mVITO-1 stark abgeschwächt ist (Abbildung 31A, Bahn 4-6). mVITO-1 zeigt hingegen keine Komplexbildung mit den MCAT Oligonukleotiden (Abbildung 31A, Bahn 7-9), was beweist, dass die Abnahme der Bindungsaffinität von TEF-1 zu den MCAT Motiven nicht aufgrund einer Konkurrenz der beiden Proteine um das selbe Bindungsmotiv erfolgt. Neben diesem spezifischen Signal, wurde auch eine unspezifische Bande detektiert, die verstärkt mit dem *Bs01*-Oligo zu beobachten war (Abbildung 31A, Bahn 1). Dieses Signal konnte jedoch auf eine Reaktion mit Komponenten des Retikulozytenlysats zurückgeführt werden, da ein EMSA mit reinem Retikulozytenlysats und *Bs01* ebenfalls ein sehr starkes Signal mit der gleichen Größe zeigte (Abbildung 31A, Bahn 10). Zur Optimierung der EMSAs wurden daher Experimente mit verschiedenen Mengen an Heringsperma-DNA und Poly dl/dc durchgeführt. Dabei erwies sich die Verwendung von 100ng Heringsperma als ausreichend, um die unspezifische Retikulozyten-Bande zu eliminieren, weshalb in allen weiteren Experimenten diese Menge als Kompetitor zu jeder Reaktion hinzugefügt wurde. Als weiterer Nachweis der Spezifität der Beobachtungen in Abbildung 31A, wurde zusätzlich ein

Kompetitions-EMSA durchgeführt (Abbildung 31B). In diesem Versuch wurde zu einer gleich bleibenden Menge von radioaktiv markierten *Bs01* Oligo und TEF-1 eine ansteigende Menge an unmarkierten Oligos gegeben. Somit entsteht ein 10facher (Abbildung 31B, Bahn 2), 100facher (Bahn 3), 200facher (Bahn 4), 500facher (Bahn 5), 1000facher (Bahn 6) oder 2000facher (Bahn 7) Überschuss an unmarkierten MCAT Motiven, welche die markierten Oligos nach und nach verdrängen.

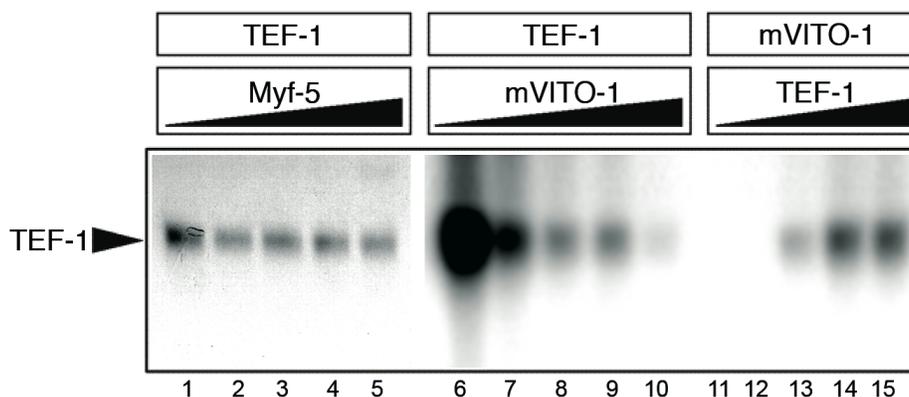


Abbildung 32. Die Verringerung der MCAT Bindungsaffinität von TEF-1 wird spezifisch durch mVITO-1 ausgelöst. Während eine ansteigende Menge an mVITO-1 die Bindung von MCAT Motiven an TEF-1 negativ beeinflusst (Bahn 6-10), werden nach Zugabe von Myf5 die DNA-Bindeeigenschaften von TEF-1 nicht verändert (Bahn 1-5). Umgekehrt kann der negative Einfluss von mVITO-1 durch ansteigende Mengen von TEF-1 wieder kompensiert werden (Bahn 11-15).

Um auszuschließen, dass die ansteigenden Konzentrationen an Retikulozytenlysat nach Inkubation beider Proteine für die Veränderungen der Bindungseigenschaften von TEF-1 verantwortlich sind, wurden weitere Kontrollen durchgeführt, die in Abbildung 32 dargestellt sind. Als erste Kontrollreaktion erfolgte eine Inkubation von TEF-1 mit ansteigenden Mengen des basischen Helix-Loop-Helix Proteins Myf5 (Abbildung 32, Bahn 1-5), das als Transkriptionsfaktor keine Interaktion mit TEF-1 eingehen sollte. Tatsächlich zeigt sich auch bei einem 2fachen Überschuss von Myf5 im Reaktionsansatz (Abbildung 32, Bahn 5) keine Veränderung der Menge an gebundenen MCAT Motiven. Ein weiterer Kontrollversuch war die Inkubation von TEF-1 mit dem Oligo *Bs03* und ansteigenden Mengen an mVITO-1 (Abbildung 32, Bahn 6-10). Es bestätigen sich hier die Beobachtungen aus den vorangegangenen Versuchen, wonach in der Gegenwart von mVITO-1 die Anzahl an MCAT/TEF-1 Komplexen deutlich verringert ist. Bei einem 4fachen Überschuss von mVITO-1 wird die Bindung der MCAT Motive durch TEF-1 dann fast völlig unterbunden (Abbildung 32, Bahn 10). Im umgekehrten Fall, d.h. bei einer unveränderten Menge an mVITO-1 und einer kontinuierlich ansteigenden TEF-1 Konzentration, zeigt sich beim Fehlen bzw. bei nur geringen Mengen an TEF-1 keine Ausbildung des TEF-1/MCAT Signals (Abbildung 32, Bahn 11 [kein TEF-1] und Bahn 12 [0,5fache Menge an TEF-1]). Sobald jedoch die Menge an eingesetzten mVITO-1 und TEF-1 gleich ist, bzw. die Konzentration von mVITO-1 die Konzentration von TEF-1 übertrifft, wird die TEF-1 Komplexbildung wieder hergestellt (Abbildung 32, Bahnen 13 [TEF-1 = mVITO-1], Bahn 14 [2facher TEF-1 Überschuss] und Bahn 15 [4facher TEF-1 Überschuss]).

Mit den EMSA Versuchen konnte somit erfolgreich ein direkter Einfluss der TEF-1/mVITO-1 Interaktion auf die DNA Bindeeigenschaften des TEF-1 nachgewiesen werden. Zwar konnte die Interaktion nicht direkt gezeigt werden, da nach Bildung eines TEF-1/mVITO-1 Komplexes und dem damit verbundenen größeren Molekulargewicht, das detektierte Signal deutlich langsamer laufen müsste und somit eine Verschiebung der Bande zu beobachten wäre. Da zum Zeitpunkt der Versuche noch kein TEF-1 Antikörper kommerziell erhältlich war, konnte zudem kein „Supershift“ zum Nachweis der spezifischen Bindung durchgeführt werden. Der „Supershift“ erfolgt durch Zugabe eines Antikörpers gegen das DNA bindende Protein. Der Protein/DNA Komplex wird durch das Binden des Antikörpers erneut vergrößert und zeigt sich durch eine Verschiebung („Shift“) im Proteingel. Es wurde zwar versucht einen „Supershift“ mit dem Myc-Antikörper gegen das mVITO-1 Protein durchzuführen, was aber nicht gelang. Trotz des Fehlens dieser Kontrolle kann aber davon ausgegangen werden, dass der negative Einfluss von mVITO-1 auf die Bindungsaffinität von TEF-1 für die MCAT Motive kein Artefakt ist, da eine Reihe anderer Kontrollversuche die Spezifität der Beobachtungen auseichend unterstreichen können (Abbildung 31B; Abbildung 32).

5.6.2. Die MCAT-Bindung von TEF-3 wird von mVITO-1 nur gering beeinflusst

Analog zu den vorangegangenen *Bandshift* Experimenten wurde auch eine Untersuchung der DNA-Bindeeigenschaften von TEF-3 durchgeführt und eine mögliche Beeinflussung durch mVITO-1 überprüft. Wiederum konnte neben einem spezifischen MCAT/TEF-3 Komplex kein Supershift, sondern nur eine unspezifische Wechselwirkung mit Komponenten des Retikulozytenlysats beobachtet werden. Ferner zeigte sich, dass die verwendeten Oligonukleotide von TEF-3 in geringerem Maße gebunden wurden, als in den Versuchen mit TEF-1 (Abbildung 33 und vergleichend Abbildung 31A). Ebenfalls wird deutlich, dass der negative Einfluss von mVITO-1 auf die DNA-Bindungseigenschaften des Transkriptionsfaktors ebenfalls wesentlich schwächer ausgeprägt ist, aber dennoch existiert. Zusammen mit den Kontrollexperimenten aus den vorherigen Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Abschwächung der MCAT Bindung um einen spezifischen Einfluss des mVITO-1 handelt und somit eine TEF-3/mVITO-1 Interaktion indirekt nachweist.

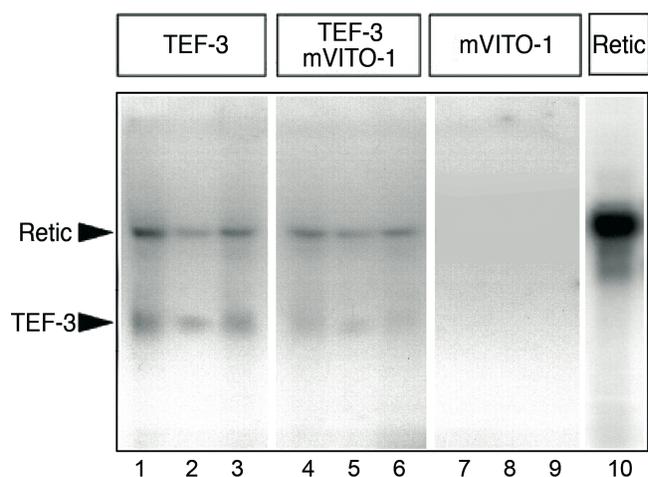


Abbildung 33. Die Interaktion von TEF-3 und den MCAT Motiven wird durch mVITO-1 nur leicht beeinflusst. Für den Versuch wurden äquimolare Mengen an *in vitro* translatierten TEF-3 (Bahn 1-3), mVITO-1 (Bahn 7-9) sowie beiden Proteinen (Bahn 4-6) zusammen mit den MCAT Motiven Bs01 (Bahnen 1, 4, 7 und 10), Bs02 (Bahnen 2, 5 und 8) sowie Bs03 (Bahnen 3, 6 und 9) inkubiert. Mit allen drei Motiven kann eine unspezifische Bande (Retic) sowie ein spezifischer Protein/MCAT Komplex (TEF-3) detektiert werden, der nach Inkubation mit mVITO-1 abgeschwächt wird. Dieser negative

Einfluss ist jedoch wesentlich geringer ausgeprägt als mit TEF-1 (Abbildung 31).

5.6.3. Die DNA Bindeigenschaften von TEF-1 werden auch durch mVITO-2 negativ beeinflusst

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von mVITO-2 auf die DNA Bindeigenschaften von TEF-1 wurden wiederum die verschiedenen Expressionskonstrukte von mVITO-2 mit den entsprechenden Deletionen der cDNA für EMSAs mit dem *Bs03* Oligo verwendet (Abbildung 34). Die ersten EMSAs wurden zunächst ohne die 100ng Heringsperma-DNA als Kompetitor durchgeführt (Abbildung 34A), weshalb hier auch wieder eine Bindung des MCAT Oligos durch Komponenten des Retikulozytenlysats erfolgte. Dies wurde ebenfalls mit einem Kontroll-EMSA überprüft, in dem ein *in vitro* Translationsansatz mit Retikulozytenlysate aber ohne Expressionsvektor für den EMSA eingesetzt wurde und ebenfalls ein deutliches Signal (Retic) auf Höhe der unspezifischen Bande zu erkennen war (Abbildung 34A, Bahn 10).

Wie bereits in den vorangegangenen EMSAs mit mVITO-1, zeigt das TEF-1 Protein nach Inkubation mit dem *Bs03* Oligo eine spezifische TEF-1/MCAT Komplexbildung (TEF-1), die deutlich von der unspezifischen „Retic-Bande“ zu unterscheiden ist (Abbildung 34A, Bahn 1). Die MCAT Oligonukleotide zeigen dagegen keine Wechselwirkung mit den verschiedenen mVITO-2 Proteinen (Abbildung 34A, Bahn 2-3), sondern binden verstärkt an die Reste des Retikulozytenlysats (Retic). Da die eingesetzten mVITO-2 Proteine damit nachweislich keine MCAT Motive binden können, muss die

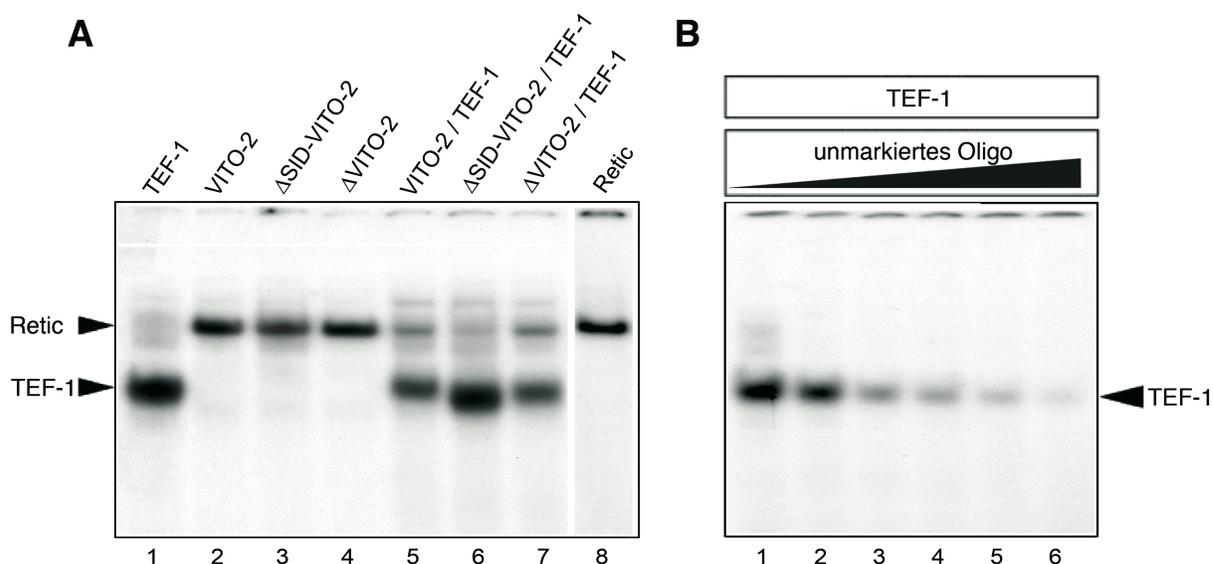


Abbildung 34. mVITO-2 beeinflusst die Bindekapazität von TEF-1 für MCAT Motive negativ. (A) Ein EMSA von TEF-1 und mVITO-2 sowie beiden Proteinen mit dem Oligo *Bs03* zeigt eine eindeutige Komplexbildung (TEF-1) zwischen TEF-1 und dem MCAT Motiv (Bahn 1). Zwischen den verschiedenen mVITO-2 Proteinen und dem Oligo kommt es hingegen zu keiner Interaktion (Bahnen 2-4), sondern zu einer verstärkten unspezifischen Komplexbildung (Retic) mit Resten

des Retikulozytenlysats (Bahn 8). Werden beide Proteine zusammen verwendet, wird die Menge an gebundenen MCAT Oligos verringert, vorausgesetzt das mVITO-2 Protein besitzt eine SID (Bahnen 5 und 7). Im Falle des Δ SID-VITO-2 (Bahn 6) werden die Bindeeigenschaften von TEF-1 hingegen nicht verändert, was die Wichtigkeit der SID zur TEF/VITO Interaktion unterstreicht. (B) Die Spezifität der Beobachtungen konnte durch einen Kompetitions-EMSA mit ansteigenden Konzentrationen an unmarkierten Bs03 Oligos nachgewiesen werden (Bahn 1, 0ng; Bahn 2, 25ng; Bahn 3, 250ng; Bahn 4, 500ng; Bahn 5, 1250ng; Bahn 6, 2500ng).

Abschwächung des MCAT Signals nach Inkubation von TEF-1 mit den mVITO-2 Proteinen auf eine Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen sein, in deren Folge die Bindung vom MCAT Motiven durch TEF-1 herabgesetzt ist (Abbildung 34A, Bahn 5-7). Allerdings erfolgt diese Abschwächung nur mit den mVITO-2 Proteinen mit vollständiger oder C-terminal verkürzter cDNA, welche die Scalloped Interaktionsdomäne besitzen (Abbildung 34A, Bahn 5 bzw. Bahn 7). Das Δ SID-VITO-2 Protein ohne SID weist hingegen keine Verringerung der Menge an gebundenen MCAT Oligos auf (Abbildung 34A, Bahn 6) und zeigt ein unverändertes Bild wie im EMSA mit TEF-1 in Bahn 1. Diese Beobachtung ist erneut ein Beweis für die Notwendigkeit der SID für eine TEF/VITO Interaktion und der damit verbundene funktionelle Einfluss auf die MCAT Bindungsfähigkeit. Als Kontrollversuch wurde wiederum ein Kompetitionsansatz mit ansteigenden Konzentrationen von unmarkierten Bs03 Oligos durchgeführt (Abbildung 34B). Dieser erbrachte den Nachweis, dass die Bindung des MCAT Fragments spezifisch ist, da das radioaktive Signal durch einen Überschuss an unmarkierten Oligos nahezu verdrängt werden konnte. Die Ergebnisse weiterer Kontrollexperimente sind in Abbildung 35 dargestellt. So wurde in einem EMSA zu TEF-1 und dem Bs03 Oligo aufsteigende Konzentrationen des Myf5 Proteins gegeben, um auszuschließen, dass die steigende Menge an Retikulozytenlysate in den Reaktionsansätzen für die Abschwächung der MCAT Bindung verantwortlich ist (Abbildung 35, Bahn 1-5). Wie erwartet, war dabei keine Änderung in der Bindungsstärke feststellbar.

In einem weiteren Versuch mit steigenden Konzentrationen von mVITO-2 oder TEF-1 (Abbildung 35, Bahn 6-10 bzw. Bahn 11-15) wurden die Beobachtungen aus den vorangegangenen EMSAs bestätigt,

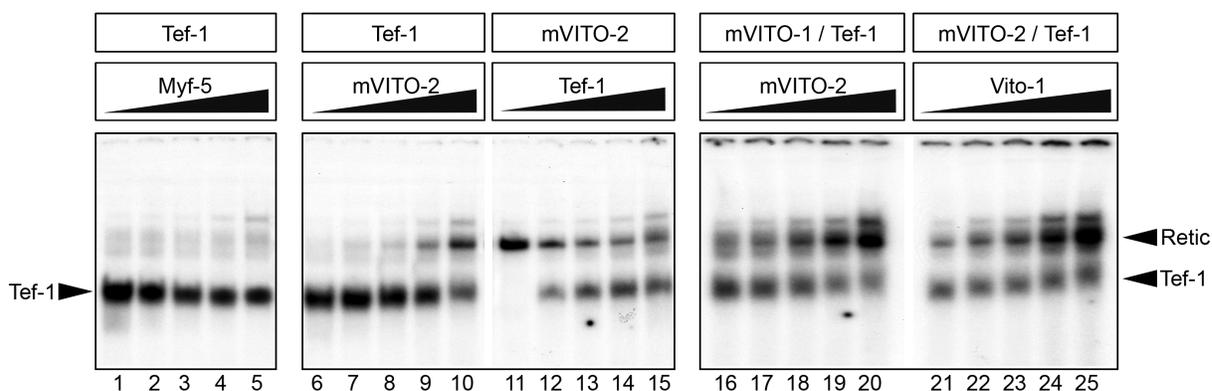


Abbildung 35. Die Veränderungen der DNA-Bindeeigenschaften von TEF-1 durch mVITO-2 sind spezifisch und können durch mVITO-1 nicht beeinflusst werden. Der Kompetitions-EMSA mit Myf5 (Bahn 1-5) zeigt keine Veränderung der des TEF-1/MCAT Komplexes, während ansteigende Konzentrationen von mVITO-2 die Menge an gebundenen MCAT Oligos verringert (Bahn 6-10).

Umgekehrt erfolgt eine Verstärkung des TEF-1/MCAT Signals, wenn in einer gleich bleibenden Menge an mVITO-2 ansteigende Konzentrationen von TEF-1 inkubiert werden (Bahn 11-15). In einem weiteren Versuch wurden verschiedene Kombinationen von mVITO-1 (Bahn 21-25) und mVITO-2 (Bahn 16-20) zusammen mit TEF-1 in einem EMSA verwendet, um mögliche Unterschiede in der Affinität der beiden VITO Proteine zu TEF-1 bzw. deren unterschiedliche Auswirkungen auf die MCAT Bindungseigenschaften zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass eine Zugabe von mVITO-2 die Menge an TEF-1/MCAT Komplexen weiter verringert (Bahn 16-20), während ein Anstieg der mVITO-1 Konzentration das MCAT Signal nicht beeinflusst (Bahn 21-25).

wonach durch die Inkubation beider Proteine die Menge an gebundenen *Bs03* Oligos deutlich herabgesetzt wird, wobei die Abschwächung im Vergleich zu mVITO-1 (siehe Abbildung 31) nicht ganz so stark ausgebildet ist. Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, bzw. Unterschiede in der Bindungsaffinität der beiden VITO Proteine zu TEF-1 feststellen zu können, wurden zwei weitere Versuche mit allen drei Proteinen durchgeführt (Abbildung 35, Bahn 16-25). Dabei zeigte sich, dass nach Inkubation von mVITO-1 mit TEF-1 die Menge an gebundenen MCAT Motiven schon reduziert ist und nach weiterer Zugabe von mVITO-2 noch weiter verringert wird (Abbildung 35, Bahn 16 und Bahn 20). Im Gegensatz dazu ist im umgekehrten Fall, d.h. bei einer gleich bleibenden Menge von TEF-1 und mVITO-2 und anschließender Zugabe von ansteigenden Konzentrationen von mVITO-1, diese Beobachtung nicht zu machen, denn die Menge an gebundenen MCAT Oligos bleibt in allen Ansätzensgleich (Abbildung 35, Bahn 21-25). Zusätzlich lässt sich in Abbildung 35 in den Bahnen 16-20 und 21-26 eine deutliche Verstärkung der unspezifischen Retic-Bande beobachten, welche auf eine steigende Verdünnung des eingesetzten Kompetitors zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich also auch für mVITO-2 ein Einfluss auf die DNA-Bindungseigenschaften von TEF-1 nachweisen, wobei diese negative Auswirkung nicht ganz so stark ausgeprägt ist wie bei mVITO-1. Der Versuch dient somit ebenfalls dem Nachweis der TEF/VITO Interaktion und demonstriert gleichzeitig eine mögliche biologische Funktion dieser Wechselwirkung, da die Affinität des TEF-1 Transkriptionsfaktors für MCAT Motive, wie sie in den Promotoren verschiedener muskelspezifischer Gene vorkommen, senkt und somit eine Änderung der TEF-abhängigen Expression bewirkt. Trotz der scheinbar geringeren Beeinflussung der DNA-Bindeeigenschaften von TEF-1 durch mVITO-2 scheint die Affinität zwischen diesen beiden Proteinen stärker zu sein, als zwischen mVITO-1 und TEF-1, da eine weitere Zugabe von mVITO-1 zu einem bereits gebildeten TEF-1/mVITO-2 Komplex keine weitere Auswirkung auf die Bindungseigenschaften von TEF-1 hat. Im Gegensatz dazu kommt es nach Zugabe von mVITO-1 zu einem bestehenden TEF-1/mVITO-2 Komplex zu keiner weiteren Beeinflussung des Transkriptionsfaktors.

5.6.4. Die Veränderungen der DNA-Bindeeigenschaften der TEFs werden durch die Anzahl der MCAT Motive beeinflusst

Die in den vorangegangenen Versuchen festgestellte Veränderung der DNA-Bindeeigenschaften der TEF Proteine durch VITO-1/2 scheint im Kontrast zu den Beobachtungen aus den Transaktivierungs-experimenten zu stehen, da hier eine Erhöhung der Reporteraktivität beobachtet

wurde. Zudem zeigte sich in den Bandshift Experimenten auch eine Beeinflussung der Bindeeigenschaften von TEF-3, woraus gleichzeitig auf eine Interaktion der beiden Proteine geschlossen werden kann, während durch die Co-Immunopräzipitation kein Nachweis der Interaktion erbracht werden konnte. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen lässt sich in der Anzahl der verwendeten MCAT Motive finden. Für die Transaktivierungsversuche wurden vierfache Wiederholungen verwendet, während in den Bandshifts Einzelkopien der MCAT Sequenzen genutzt wurden.

In vorangegangenen Experimenten anderer Arbeitsgruppen konnte bereits gezeigt werden, dass das Bindungsverhalten von hTEF-3 von der Anzahl der Bindungsmotive abhängig ist. Eine Vermehrung der Bindungsstellen resultierte in einer relativen Abschwächung der Bindung zum hTEF-3 (Jacquemin *et al.* 1996). Im Falle des hTEF-1 konnte dagegen keine solche Veränderung festgestellt werden.

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften der Wiederholungen wurden die für die Herstellung des *pTA-Luc* MCAT Reporterkonstrukts verwendeten Oligonukleotide *Box1_fw* und *Box1_rev* aneinander gelagert und anschließend mit α [32 P]-dCTP radioaktiv markiert. Das doppelsträngige Oligonukleotid wurde danach mit TEF-1 und TEF-3 sowie den VITO Proteinen auf eine Bindung untersucht. Aufgrund eines experimentell bedingten starken Hintergrunds der multimeren MCAT Sonde, erbrachten nur die Versuche mit VITO-1 auswertbare Ergebnisse, die in Abbildung 36 dargestellt sind. Wie bereits vermutet, lässt sich eine Bindung der multimeren MCAT Motive nur von TEF-1 mit oder ohne VITO-1 beobachten, während eine Interaktion zwischen dem Oligonukleotid und mTEF-3 oder mVITO-1 nicht nachgewiesen werden konnte. Weitaus wichtiger ist jedoch die Beobachtung, dass im Gegensatz zu den einzelnen MCAT Motiven, die DNA-Bindefähigkeit von TEF-1 zum multimeren MCAT Oligo durch die Interaktion mit VITO-1 nicht abgeschwächt wird. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Veränderung der Bindungseigenschaften von TEF-1 je nach Anzahl der Motive unterschiedlich erfolgt und liefert zudem eine Erklärung für die scheinbar gegensätzlichen Ergebnisse der Bandshift- und Transaktivierungsexperimente. Darüber hinaus könnte die Unfähigkeit des TEF-3 zur Bindung an Wiederholungen des MCAT Motivs die Ursache für eine ausbleibende bzw. geringfügige Transaktivierung des TEF-3/VITO Komplexes in den MCAT Reporter-Assays sein.

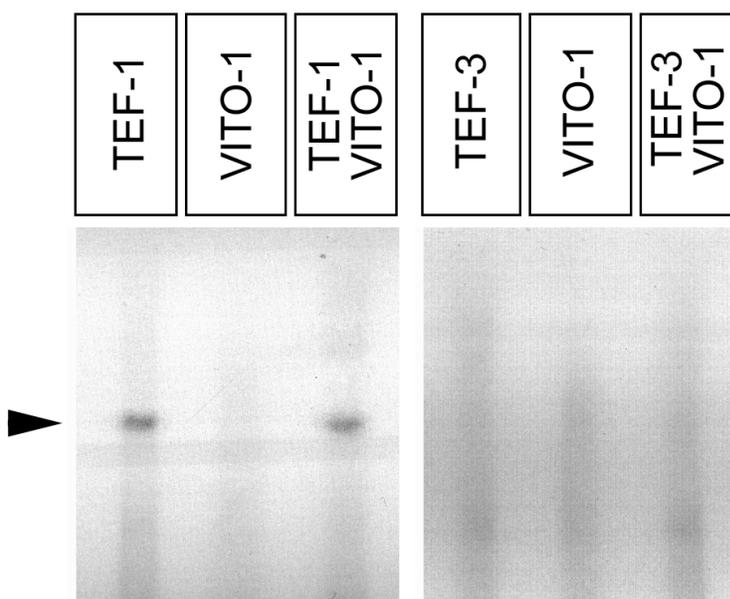


Abbildung 36. Die autoradio-graphische Auswertung der Interaktion zwischen multimeren MCAT Oligo-nukleotiden und den TEF

Proteinen zeigt eine exklusive Wechselwirkung mit TEF-1, die im Gegensatz zu einzelnen Motiven durch Zugabe von VITO-1 nicht negativ beeinflusst wird (Pfeil, Bahn 1 und 3). Weder VITO-1 allein (Bahn 2 und 5) noch mTEF-3 (Bahn 4 und 6) können das Oligo-nukleotid binden und unterstreichen damit die spezifische Interaktion von TEF-1 mit multimeren MCAT Motiven. fO, freie Nukleotide.

5.7. Gezielte Veränderung des mVITO-2 Genlocus

Mit Hilfe der *in vitro* Translation konnten mit den VITO Proteinen bereits eine Reihe von Untersuchungen zu deren biochemischen Funktionen *in vitro* durchgeführt werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse lieferten bereits erste Anhaltspunkte für die biologische Funktion der Genfamilie. Um jedoch die tatsächliche Ausgabe der beiden potentiellen Cofaktoren *in vivo* zu identifizieren, ist die Entwicklung entsprechender Mausmodelle ein wichtiges Hilfsmittel. So wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits mit den Arbeiten an einem *LacZ Knock In* für den *mVITO-1* Locus begonnen. Da jedoch aufgrund der hohen Homologie und der teilweise überlappenden Expressions-muster der beiden Proteine auch eine funktionelle Überlappung und somit Kompensation zu erwarten ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein konditioneller *Knock Out* Mausstamm für *mVITO-2* hergestellt.

5.7.1. Isolierung von Cosmid-Klonen mit genomischen Fragmenten des *mVITO-2* Gens

Da für die Konstruktion des „Targeting“ Vektors ausreichend lange, genomische DNA-Abschnitte benötigt werden, musste zunächst ein geeignetes Screening zur Identifizierung potentieller genomischer Klone durchgeführt werden. Dazu wurde eine Methode verwendet, die vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung entwickelt wurde und im wesentlichen auf einer 2-stufigen PCR-Amplifikation gen-spezifischer Sequenzabschnitte aus einem definierten Klonpool beruht. Dabei konnten im Screening des Primärpools (Mouse [Strain, 129/ola] Cosmid, bestehend aus 99 Primärpools) insgesamt 3 positive Signale detektiert werden, welche jeweils den vereinigten Cosmid-Klonen von acht 384-well Platte entsprachen. Im nächsten Schritt wurden durch jeweils 48 weitere PCRs, die entsprechenden Cosmid-Klone identifiziert.

5.7.2. Konstruktion des „Targeting“ Vektors zur Generierung eines konditionellen *mVITO-2* Gens

Der zur Konstruktion des „Targeting“ Vektors verwendete Cosmid Klon wurde als VC1 bezeichnet und beinhaltete 48kbp genomische DNA, welche den Promoterbereich sowie die Exone I bis III von *mVITO-2* umfasste (RZPD-clone: MPMGc121D16799). Zunächst wurde ein 4,3 kbp Fragment,

welches als kurzer 3' Rekombinationsarm dienen sollte, durch einen kombinierten Sall und XhoI Restriktionsverdau isoliert und in einen modifizierten *pKSII* Vektor (*pKSIIV2N*) kloniert. Parallel dazu wurde durch Verdau mit SacII und Sall ein 13,9 kbp langes Fragment isoliert, welches den Promoterbereich des *mVITO-2* Gens sowie die ersten beiden Exone enthielt. Dieses Fragment wurde ebenfalls in einen modifizierten Vektor (*pKSIIV2*) zwischen kloniert und stellt den langen 5' Rekombinationsarm dar. Durch Verdau mit dem Restriktionsenzym BstAPI, dessen Erkennungstelle genau zwischen Exon I und Exon II liegt, wurde der Vektor wieder geöffnet um die singuläre loxP Sequenz einzufügen. Dazu wurden zwei komplementäre Primer generiert, die neben der eigentlichen loxP Sequenz, Restriktionsschnittstellen zur Identifizierung positiver Rekombinationsereignisse sowie kompatible überhängende 5' Enden für die BstAPI Schnittstelle enthielten. Durch 5minütiges Kochen bei 95°C und anschließendes langsames Abkühlen auf Raumtemperatur, bildeten die Primer ein doppelsträngiges DNA Fragment, welches in den *pKSIIV2* Vektor kloniert wurde. Der damit neu entstandene 5' Rekombinationsarm mit der loxP Sequenz wurde durch erneuten kombinierten SacII und Sall Verdau isoliert und in den eigentlichen „Targeting“ Vektor *pKOIIV2* kloniert. Dieser wurde zuvor aus dem *pKOII* Vektor durch Modifizierungen in den beiden multiplen Klonierungsstellen generiert und somit für die Konstruktion des *mVITO-2 Knock Outs* angepasst.

Im letzten Schritt wurde der kurze 3' Rekombinationsarm aus dem *pKSIIV2N* Vektor in das „Targeting“ Konstrukt kloniert. Dabei wurde einmal das vollständige 4,3 kbp Fragment - durch Verdau mit den flankierenden Restriktionsenzymen SnaBI und PacI - verwendet sowie ein kürzeres 2,8 kbp Fragment, das nach Verdau mit dem flankierenden XhoI und internen HindIII isoliert wurde.

Somit wurden 2 „Targeting“ Konstrukte generiert, die jeweils einen 13,9 kbp langen 5' Rekombinationsarm sowie einen 4,3 kbp (*pKOII-mVITO-2 long*) bzw. 2,8 kbp (*pKOII-mVITO-2 short*) langen 3' Rekombinationsarm enthielten (Abbildung 37). In beiden Konstrukten wird jeweils das Exon II, welches die gesamte Scalloped Interaktionsdomäne beinhaltet von den beiden loxP Erkennungsstellen flankiert. Nach Rekombination mit Cre-Rekombinase, sollte es somit zu einer Deletion der SID und einem damit verbundenen Verlust der beobachteten Eigenschaften von *mVITO-2* führen (siehe 5.4. bis 5.6.2.). Die Entwicklung eines *mVITO-2* Mausmodells bietet folglich eine ideale Möglichkeit die biologische Funktion des Gens aufzuklären. Die Verwendung eines konditionellen *Knock Out* Allels ermöglicht zudem, einen potentiellen letalen Phänotyp der Nullmutation genauer zu untersuchen sowie eine kombinierte Ausschaltung der beiden VITO Gene zu etablieren.

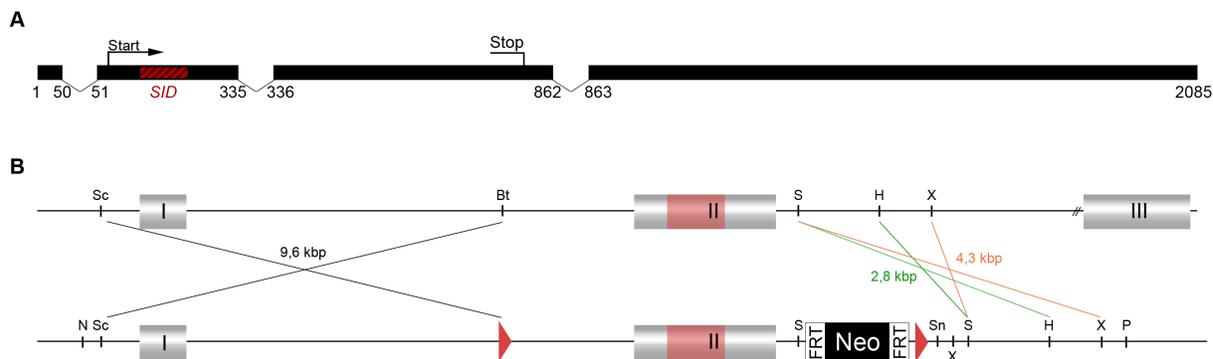


Abbildung 37. Die Generierung der mVITO-2 „Targeting“ Vektoren. **A:** Die genomische Struktur von mVITO-2 setzt sich aus den Exonen I bis IV zusammen. Die Größe der dazwischen liegenden Introns beträgt 11,5 bis 20kbp. Alle Genabschnitte wurden in 5' nach 3' Orientierung angegeben. Der Start und das Ende des offenen Leserahmens sowie die Scalloped Interaktionsdomäne (SID) eingezeichnet. Die Zahlen bezeichnen die Position der Base in der cDNA-Sequenz. **B:** Die „Targeting“-Vektoren (unten) enthalten, neben den Exonen I und II, ein FRT flankiertes Neomycinphosphotransferase-Gen (Neo) im Intron 2 sowie zwei loxP Erkennungstellen (rote Dreiecke). Die Rekombination mit der genomischen Wildtyp-DNA (oben) erfolgt über zwei homologe Bereiche mit 9,6 kbp und 4,3 kbp (mVITO-2 long, orange) bzw. 2,8 kbp (mVITO-2 short, grün) Länge. Für die Klonierung relevante Restriktions-schnittstellen wurden eingezeichnet (S, SacII; Bt, BstAPI; N, NotI; X, XhoI; Sn, SnaBI; P, PacI und H, HindIII). Durch Cre-vermittelte Rekombination kann somit das Exon II, zusammen mit der SID (rote Abschnitte), deletiert werden. Ein Entfernen der Neomycin-Selektions-Kassette ist durch eine FIp-Rekombinase-vermittelte Rekombination möglich.

5.7.3. Homologe Rekombination des „Targeting-Vektors“ in ES-Zellen

Für die homologe Rekombination des mVITO-2 „Targeting“ Vektors wurden 1×10^7 embryonale Stammzellen der männlichen Linie ES-MK-V8.1 mit $25 \mu\text{g}$ NotI linearisierter DNA vom *pKOII-mVITO-2 short* Konstrukt elektroporiert und je 2×10^6 ES-Zellen auf Feederzell-Platten (\varnothing 10cm) ausgesät. Nach 9-10 Tagen Selektion in G418 enthaltendem ES-Zellkulturmedium wurden resistente ES-Zell-Kolonien isoliert. Durch eine Southern-Blot-Hybridisierung mit der Sonde III, die außerhalb des „Targeting“-Vektors bindet (Abbildung 38A), wurden alle Klone identifiziert, die den veränderten genomischen DNA-Abschnitt durch homologe Rekombination in den mVITO-2 Locus aufgenommen hatten. Dazu wurde die genomische DNA der ES-Klone nach Verdau mit dem Restriktionsenzym BglII auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Als radioaktive Sonde wurde ein 505 bp langes DNA-Fragment verwendet (Sonde III), welches durch Restriktionsverdau eines genomischen Fragments (#59; *Vito-2 3' Fragment in pucV2*) mit ApaLI, AatII und HindIII isoliert wurde und auf einem Sequenzbereich 3' außerhalb des „Targeting“-Vektors hybridisiert. Im Wildtyp-Allel des *Pax7* Gens wird ein Fragment von 12,3 kbp hybridisiert, während nach erfolgreicher homologer Rekombination ein DNA-Fragment von

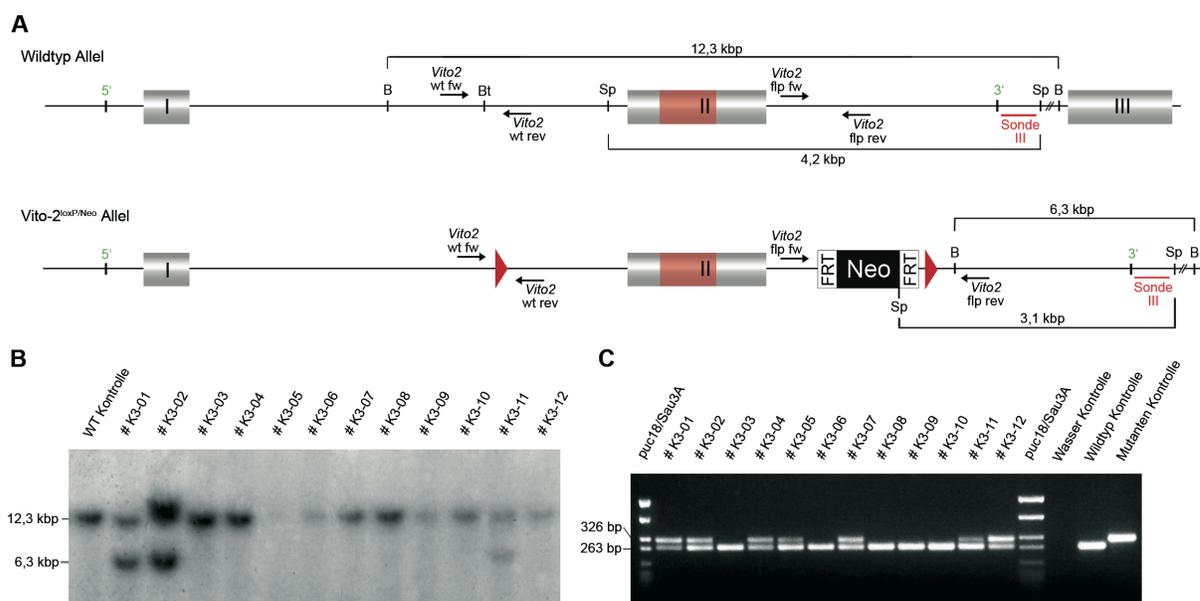


Abbildung 38. Identifizierung homologer Rekombinationsereignisse im mVITO-2 Genlocus. **A:** Schematische Darstellung des Wildtyp- und mVITO-2^{loxP/Neo} Allels nach homologer Rekombination. Die Position der Hybridisierungssonde III wurde mit einem roten Balken markiert und die kodierenden Exone I bis III mit der Scalloped Interaktionsdomäne (rot abgesetzt) eingezeichnet. Die eingeführten loxP-Elemente wurden mit roten Dreiecken sowie das synthetische Neomycinphosphotransferase-Gen mit NEO/FRT markiert. Für die Southern-Blot-Analyse relevante Restriktionsschnittstellen wurden eingezeichnet (Sp, SpeI; Bt, BstAPI und B, BgIII) und das 5'- bzw. 3'-Ende des "Targeting"-Vektors mit grünen Ziffern gekennzeichnet. Die Oligonukleotide für die PCR wurden als schwarze Pfeile eingefügt (Vito2 wt fw; Vito2 wt rev; Vito2 flp fw; Vito2 flp rev). **B:** Southern Blot Analyse von ES-Klonen nach BgIII-Verdau und Detektion mit der Sonde III. Die DNA-Fragmentgrößen wurden in Kilobasenpaaren (kbp) angegeben. **C:** Agarosegelelektrophorese der PCR-Analyse der ES-Klone mit den Oligonukleotiden Vito2 wt fw und Vito2 wt rev. Als Größenmarker wurde mit Sau3A geschnittene puc18 DNA verwendet. Die Größe der Fragmente ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

6,3 kbp detektiert wird (Abbildung 38B). Um nachzuweisen, dass die Rekombination im 5' Bereich des „Targeting“-Vektors auch tatsächlich vor der eingeführten einzelnen loxP Erkennungstelle erfolgt ist (siehe Abbildung 37B), wurde zusätzlich eine PCR-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die Primer Vito2 wt fw und Vito2 wt rev verwendet, die eine Amplifikation über die BstAPI Schnittstelle im langen homologen Arm erlauben (Abbildung 38A). Sollte, wie im Wildtyp, an der Restriktionsschnittstelle keine loxP Sequenz vorhanden sein, wird ein 263 bp Fragment amplifiziert. Beim Vorhandensein der eingeführten loxP Erkennungsstelle wird das PCR-Produkt um die 63 Basen der eingeführten loxP Sequenz vergrößert und somit ein 326 bp großes Fragment amplifiziert (Abbildung 38C). In den ersten beiden Elektroporationen wurden insgesamt 768 isolierte ES-Kolonien (2x 384) untersucht und dabei insgesamt 28 ES-Klone mittels Southern-Hybridisierung als positiv identifiziert. In der nachfolgenden Untersuchung mittels PCR konnte für 16 Klone ein korrektes Rekombinationsereignis nachgewiesen werden. Die Blastozysten-Injektion dieser Klone resultierte jedoch in keinen oder nur gering chimären Nachkommen, weshalb eine erneute Elektroporation mit neuen ES-Zellen (ES-MK-V6.5) durchgeführt wurde. Von den 576 neu isolierten ES-Zell-Kolonien konnte dabei für 91 Klone ein korrektes Rekombinationsereignis durch Southern Blot nachgewiesen werden. 24 dieser Klone zeigten auch in

der PCR-Genotypisierung ein korrektes Bandenmuster und konnten somit für die weiteren Schritte verwendet werden. Die Genotypisierung, des für die Injektion in C57Bl/6 Mausblastozysten eingesetzten, positiven *mVITO-2^{loxP/Neo}* ES-Zell-Klons K3-01, ist in Abbildung 38 dargestellt.

Insgesamt wurden zwei positive Klone (K3-01 und K3-142) für die Blastozysteninjektion eingesetzt. Für beide injizierten Klone wurden jeweils 3 Chimären geboren. Die hochchimären Nachkommen (#15821, #15830 und #16675) aus der Injektion des Klones K3-01 gaben, nach Rückkreuzung mit C57Bl/6 Tieren das manipulierte *mVITO-2* Allel in der Keimbahn weiter und wurden deshalb als Gründertiere bezeichnet (siehe Abbildung 39). Diese Tiere dienten im weiteren Verlauf als Grundlage zur Etablierung der Mauslinien *mVITO-2cKO* und *mVITO-2KO*.

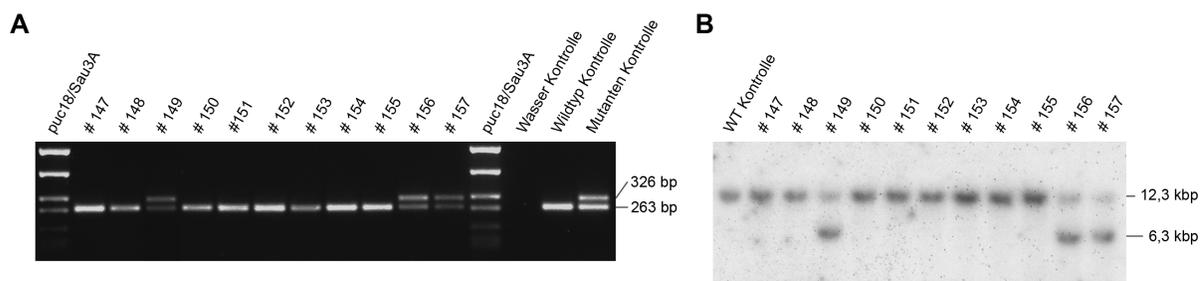


Abbildung 39. Genotypisierung von Nachkommen aus der Rückkreuzung des *mVITO-2cKO* Gründertieres (#15830) mit C57Bl/6 durch PCR (A) und Southern Blot (B). Die PCR Genotypisierung erfolgte mit den Primern *Vito2 wt fw* und *Vito2 wt rev*, wobei eine Mutantenbande von 326 bp und eine Wildtyp-Bande von 263 bp entstand. Der Southern Blot erfolgte nach Restriktionsverdau mit *BglII* und wurde mit der Sonde III hybridisiert. Die Größe des detektierten Wildtyp-Fragments beträgt dabei 12,3 kbp, während das hybridisierte Fragment des *mVITO-2^{loxP/Neo}* Allels ca. 6 kbp kleiner ist und ca. 6,3 kbp groß ist.

5.7.4. Etablierung der *mVITO-2cKO* Mauslinie mit homozygoten *mVITO-2^{loxP}* Allel

Gleichzeitig zur Rückkreuzung der hochchimären Gründertiere, wurden auch Verpaarungen mit Flp-Deleter-Mäusen durchgeführt, um die *mVITO-2cKO* Mauslinie zu erzeugen, in der die geflochtenen *mVITO-2* Allele zwar vorhanden sind, die Neomycin-FRT-Selektionskassette jedoch bereits wieder deletiert wurde. Um einen möglichst gleichmäßigen genetischen Hintergrund zu behalten, wurde hierzu ausschließlich das chimäre Männchen #15821 mit Flp-Deleter Weibchen verpaart (Abbildung 40).

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte durch PCR und Southern Hybridisierung. Für die PCR-Genotypisierung wurden die Primer *Vito2 flp fw* und *Vito2 flp rev* verwendet, die auf dem Wildtyp-Allel zur Amplifikation eines 218 bp Fragments führen. Bei der Anwesenheit der FRT-Neomycin-Kassette im Allel wird kein Produkt amplifiziert. Nach Deletion der Neo-Kassette durch die Flp-Rekombinase ist das erhaltene PCR-Produkt, aufgrund der weiterhin vorhandenen loxP Sequenz und verbliebener

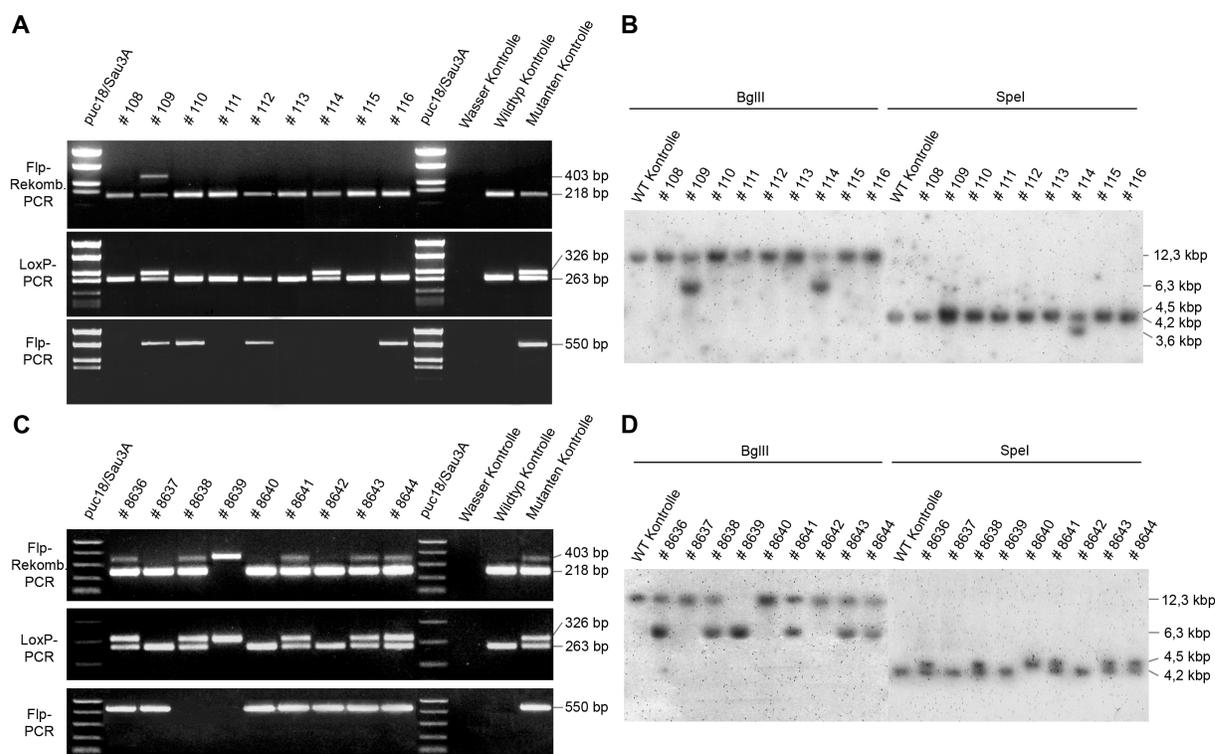


Abbildung 40. Durch Einkreuzung der konstitutiv Flp-Rekombinase exprimierenden TG Flp-Deleter Linie wurde die NeoFRT-Kassette aus dem $mVITO-2^{loxP/Neo}$ Allel entfernt und somit die $mVITO-2cKO$ Mauslinie etabliert. Genotypisierung der Nachkommen der Verkreuzung aus Flp-Deleter Mäusen mit dem $mVITO-2cKO$ Gründertier #15821 durch PCR (A und C) und Southern Blot (B und D). Die PCR erfolgte mit den Primerpaaren Vito2 flp fw/rev (A und C, oben), Vito2 wt fw/rev (A und C, Mitte) sowie Flp fw/rev (A und C, unten). Die Größen der entstandenen Mutanten- bzw. Wildtyp-Banden sind in der Abbildung angegeben. Der Southern Blot erfolgte nach Restriktionsverdau mit BglII (rechts) und SpeI (links) und wurde jeweils mit der Sonde III hybridisiert. Die Größe des detektierten Wildtyp-Fragments beträgt nach BglII Verdau 12,3 kbp und nach SpeI Verdau 4,5 kbp. Das hybridisierte Fragment des $mVITO-2^{loxP/Neo}$ und $mVITO-2^{loxP}$ Allels ist nach BglII Verdau 2,8 kbp groß. Im Southern Blot nach SpeI Verdau wird im $mVITO-2^{loxP/Neo}$ Allel ein 3,6 kbp großes Fragment hybridisiert, was deutlich als Doppelbande zu erkennen ist. Nach Deletion der NeoFRT-Kassette, wird im $mVITO-2^{loxP}$ Allel ein 4,5 kbp großes Fragment detektiert, welches jedoch nur als verstärktes Signal gegenüber der Wildtyp-Bande zu erkennen ist.

„Konstruktions-Sequenzen“, um 185 bp auf eine Gesamtgröße von 403 bp vergrößert (Abbildung 40, A). Die Richtigkeit der PCR wurde durch einen Southern Blot bestätigt, wofür die genomische Mausschwanz-DNA mit BglII und zusätzlich mit SpeI verdaut wurde. Die Hybridisierung erfolgte in beiden Fällen mit der Sonde III. Der Southern Blot mit BglII entspricht der Standard-Genotypisierung (siehe Abbildung 39), während in der Wildtyp-Situation der Verdau mit SpeI zur Detektion eines 4,2 kbp Fragments führt. Nach korrekter Rekombination des „Targeting“ Vektors in den $mVITO-2$ Locus, sollte ein verkürztes Fragment von 3,6 kbp entstehen, dass nach Deletion der Neomycin-Kassette wiederum auf 4,5 kbp Länge vergrößert wird (Abbildung 40B). Aufgrund der eingeschränkten Auflösung des Southern Blots ist die 4,2 / 4,5 kbp Doppelbande des $mVITO-2^{loxP}$ Allels nur als stärkeres Signal gegenüber der Wildtyp-Bande zu erkennen, kann jedoch deutlich von der 4,2 / 3,6 kbp Doppelbande des $mVITO-2^{loxP/Neo}$ Allels unterschieden werden (Abbildung 40B, rechts, Bahnen #109 und #114). In

Kombination mit dem BglIII Southern Blot und der PCR-Genotypisierung können die verschiedenen *mVITO-2* Allele eindeutig identifiziert werden.

Aus der ersten Verpaarung ging zunächst nur ein Männchen hervor (#109; siehe Abbildung 40A und B), welches mit ebenfalls heterozygoten Weibchen aus nachfolgenden Verkreuzungen verpaart wurde. Der erste homozygote Nachkomme (#8639; siehe Abbildung 40C und D) wurde zunächst mit heterozygoten Partnern verpaart um weitere homozygote Tiere zu erhalten. Zur Erhaltung und Verbreiterung der Linie wurden nachfolgend ausschließlich homozygote Mäuse verpaart. Die Genotypisierung erfolgte dabei durch PCR (siehe Abbildung 40).

5.7.5. Die funktionelle Ausschaltung des *mVITO-2* Gens durch Cre-vermittelte Rekombination

Zur funktionellen Ausschaltung des *mVITO-2* Gens wurde durch Einkreuzung des Cre-Deleter Allels die *mVITO-2KO* Linie etabliert. Die im Cre-Deleter Transgen konstitutiv exprimierte Cre-Rekombinase deletiert im *mVITO-2^{loxP}* bzw. *mVITO-2^{loxP/Neo}* Allel das zweite Exon, welches die für die TEF-1 Interaktion notwendige Scalloped Interaktionsdomäne enthält. Die somit erzeugte *mVITO-2* Mutation sollte entweder zur Translation eines Proteins ohne die SID führen, oder eine Nullmutation hervorrufen. Für die Herstellung dieser Mauslinie wurde erneut das hochchimäre Männchen #15821 mit Cre-Deleter Weibchen verpaart, um einen möglichst gleichmäßigen genetischen Hintergrund zu erhalten.

Unter den Nachkommen des ersten Wurfs waren 2 Weibchen [#3019 und #3020], die eine Deletion des zweiten Exons aufwiesen (Abbildung 41). Die Überprüfung des Genotyps erfolgte zunächst durch PCR und Southern Blot. Für die PCR wurden drei verschiedene Primerkombinationen verwendet: Die Cre-spezifische PCR mit den Primern *Cre fw* und *Cre rev* diente dem Nachweis des transgenen Cre-Deleter Allels (Abbildung 41A und C, unten), während die zwei weiteren PCRs die korrekte Deletion nachweisen sollten. Die Primerkombination *Vito2 wt fw* und *Vito2 wt rev* weist das Wildtyp-Allel durch die Amplifikation eines 263 bp Fragments nach und führt dagegen beim Vorhandensein des mutierten *mVITO-2^{loxP/Neo}* Allels zur Bildung eines 326 bp großen Produkts (Abbildung 41A und C, Mitte). Nach korrekter Deletion des zweiten Exons wird indessen keines der beiden Produkte amplifiziert. Als weiterer Nachweis wurde eine PCR mit den Primern *Vito2 fw* und *Vito2 rev* durchgeführt, die

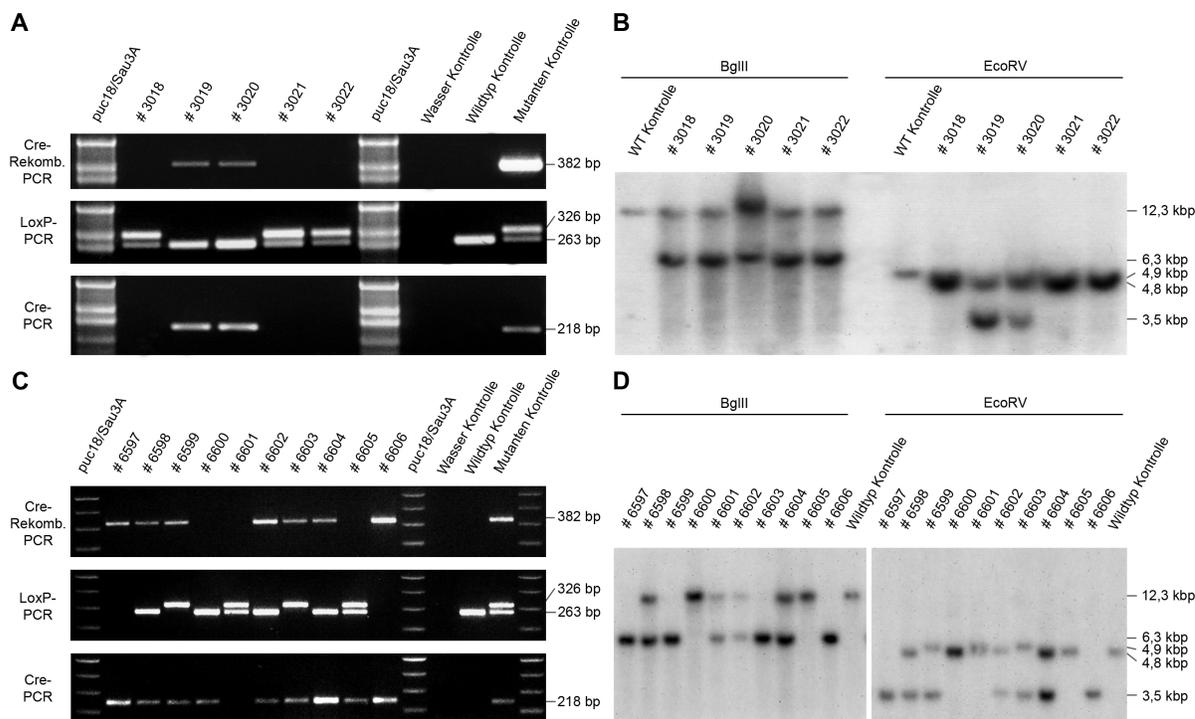


Abbildung 41. Die Deletion des zweiten Exons von *mVITO-2* durch Cre-vermittelte Rekombination in der *mVITO-2* KO Mauslinie. (A, C) Die Bestimmung des Genotyps erfolgte durch PCR mit drei Primerkombinationen für den Nachweis des CMV-Cre Allels (unten), der *mVITO-2^{LoxP}* bzw. *mVITO-2^{LoxP/Neo}* Allele (Mitte) und des *mVITO-2^{delta}* Allels (unten). Die Größe der PCR-Produkte wurden jeweils angegeben. (B, D) Zur Überprüfung der PCR wurde ein Southern Blot mit der Sonde III nach *Bgl*III und *Eco*RV Verdauung durchgeführt, der übereinstimmende Ergebnisse erbrachte.

nach korrekter Cre-Rekombination zur Amplifikation eines 382 bp Fragments führt (siehe Abbildung 38; Abbildung 41A und C, oben). Die Southern Blot Genotypisierung erfolgte nach Verdauung mit *Bgl*III und *Eco*RV und Hybridisierung durch die Sonde III. Die Größen der detektierten Fragmente nach *Bgl*III Verdauung entsprechen der Standardgenotypisierung (siehe Abbildung 39). Nach Verdauung mit *Eco*RV beträgt die Größe des hybridisierten Wildtyp-Fragments 4,8 kbp, während im *mVITO-2^{LoxP/Neo}* Allel ein 3,5 kbp großes Fragment detektiert wird. Erfolgt eine korrekte Deletion des zweiten Exons, hybridisiert die Sonde III im somit entstandenen *mVITO-2^{delta}* Allel nach *Bgl*III Verdauung mit einem 12,3 kbp Fragment, während nach Verdauung mit *Eco*RV eine Hybridisierung bei 4,8 kbp erfolgt. Eine eindeutige Genotypisierung mittels Southern Blot kann somit nur durch eine kombinierte Analyse erfolgen.

Um homozygote *mVITO-2^{delta}* Mäuse zu erhalten, wurden die heterozygoten Weibchen wiederum mit dem chimären Männchen #15821 zurückgekreuzt. Unter den Nachkommen dieser Würfe waren insgesamt 2 homozygote Tiere (Abbildung 41C und D). Alle Nachkommen zeigten eine normale postnatale Entwicklung und keine offensichtlichen Veränderungen im Phänotyp. Daher wurden zur Aufrechterhaltung der Linie nachfolgend nur homozygote Tiere verpaart, wobei die standardisierte Genotypisierung durch PCR erfolgte. Eine detaillierte Analyse der *VITO-2* homozygoten Mutanten befindet sich zur Zeit in Arbeit, konnte jedoch aus Zeitgründen nicht mehr in die vorliegende Dissertation eingeschlossen werden.

5.8. Suche nach muskeldifferenzierungs-fördernden Substanzen in einer pharmakologischen Stoffbibliothek

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Zell-basierendes Screening einer pharmakologischen Substanzbibliothek (LOPAC) auf muskeldifferenzierungsfördernde Eigenschaften durchgeführt werden. Das Experiment beruht im Wesentlichen auf der Beobachtung, dass die Myoblasten-Linie C₂C₁₂ unter niedrigen Serumkonzentrationen durch Beginn der terminalen Differenzierung zunächst Synzytien und später Myotuben bildet. In einem vorangegangenen Experiment konnte dieser Vorgang auch durch Zugabe von Kinetin und Benzyladenin unter „normalen“ Proliferationsbedingungen beobachtet werden. Diese beiden Stoffe gehören zu der Stoffklasse der Zytokine und waren bislang ausschließlich als Pflanzenhormone bekannt, welche die Balance zwischen Wachstum und Nährstoffangebot regulieren (Kakimoto 1998; Sakakibara 2005). Die Idee der Untersuchung war somit, durch ein Screening einer Substanzbibliothek weitere niedermolekulare Stoffe, mit bislang unbekanntem muskeldifferenzierungs-fördernden Eigenschaften, zu identifizieren.

5.8.1. Screening der LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek durch Messung der MCK-Enzymaktivität

Die für das Screening eingesetzte LOPAC Bibliothek umfasst insgesamt 1280 aktive Substanzen, die mit der Myoblasten-Zelllinie C₂C₁₂ getestet wurden. Die Proliferation dieser Zelllinie erfolgt unter 20% FKS, während sich die Differenzierung der C₂C₁₂ Zellen zu Myotuben nur unter geringen Serumkonzentrationen (2% Pferde-Serum) ereignet. Die Substanzen wurden daher unter 20% FKS zu den Zellen gegeben und anschließend für 7 Tage inkubiert. Als Positiv- bzw. Negativkontrollen wurden jeweils Zellen ausschließlich mit 20% FKS und 2% Pferde-Serum inkubiert.

Die Messung des Differenzierungsgrades erfolgte durch Messung der Muskel-Kreatin-Kinase Aktivität (*engl.*: MCK). Die MCK wird fast ausschließlich im differenzierten Skelettmuskel und nur in geringen Mengen im Herzen und im Hirn exprimiert und gilt somit als sicherer Marker für eine Muskel-Differenzierung (Faulker und Meites 1982).

Das gesamte Screening wurde in 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei auf jeder Platte jeweils 10 Reihen mit insgesamt 80 Substanzen untersucht wurden und je eine Reihe als Positiv- und Negativkontrolle vorhanden waren. Da die Substanzen in DMSO gelöst waren, wurden je 4 Wells der Positiv- bzw. Negativkontrollreihe zusätzlich mit den entsprechenden Konzentrationen an reinem DMSO inkubiert. Da für den Versuch jeweils 50 μ mol und 100 μ mol der Substanzen eingesetzt wurden, ergab sich somit eine Gesamtzahl von 2 x 16 Mikrotiterplatten.

Nach 7-tägiger Inkubation wurden die Zellen durch Zugabe von NP40-Lysis-Puffer und 2maligem Einfrieren und Auftauen lysiert und mit dem MCK Aktivitätstest der Firma BioQuant im Berthold Mithras LB940 Plattenreader vermessen. Exemplarisch für alle Messungen ist die Auswertung der ersten drei Platten in Abbildung 42 dargestellt. Die ersten acht Messungen (X-Achse, Reihe 1) stellen jeweils die Negativkontrolle und die letzten acht Messungen (X-Achse, Reihe 12) die Positivkontrolle dar, wobei jeweils die ersten vier Werte der Inkubation mit DMSO und die letzten vier Werte der Inkubation ohne

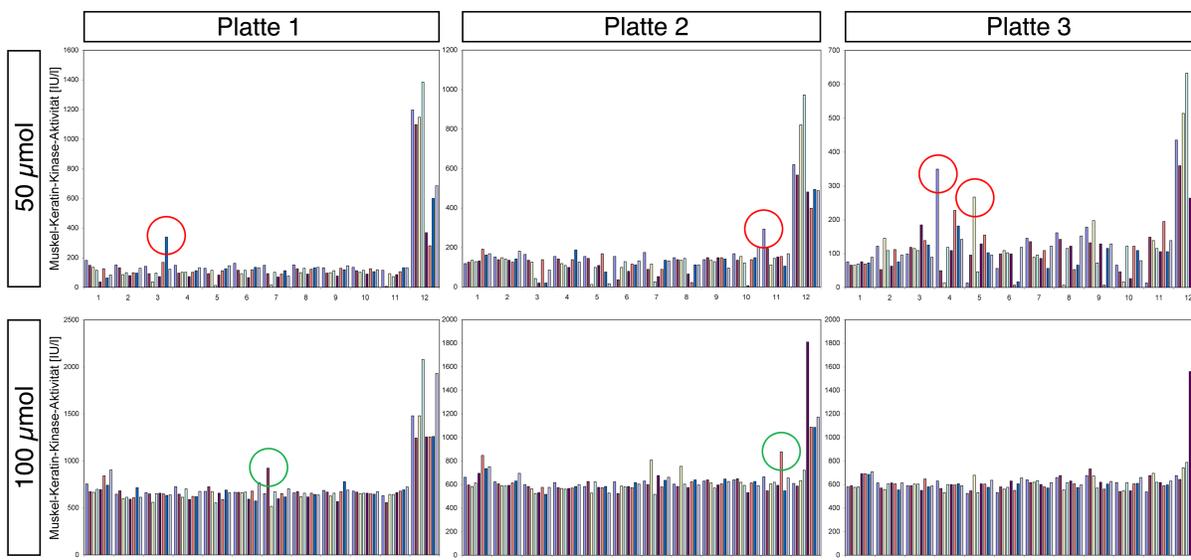


Abbildung 42. Exemplarische Darstellung des Screenings der LOPAC¹²⁸⁰ Stoffbibliothek mit der C₂C₁₂ Myoblasten-Zelllinie. Untersucht wurden Veränderungen der terminalen Differenzierung durch Messung der Muskel-Kreatin-Kinase Aktivität. Gezeigt wird die Auswertung der Messungen von drei der sechzehn 96-Well Mikrotiterplatten mit zwei verschiedenen Substanz-Konzentrationen (50 µmol und 100 µmol). Jede der Mikrotiterplatten setzt sich aus jeweils 80 verschiedenen Substanzen (Reihen 2 - 11), acht Negativkontrollen (Reihe 1) und acht Positivkontrollen (Reihe 12) zusammen. Da die Substanzen in DMSO gelöst waren, wurden jeweils die ersten vier Ansätze der Positiv- und Negativkontrollen mit der entsprechenden Konzentration an DMSO inkubiert. Beispiele für einen Anstieg der MCK-Aktivität nach Inkubation mit den LOPAC Substanzen wurden mit roten und grünen Markierungen gekennzeichnet und geben demzufolge Hinweise auf eine mögliche terminale Differenzierung der C₂C₁₂ Zellen unter „normalen“ Wachstumsbedingungen.

DMSO entsprechen. Der Vergleich dieser Werte in den einzelnen Messungen zeigt bereits eine Erhöhung der MCK-Aktivität nach Inkubation mit DMSO, was auf eine Beeinflussung der Muskel-Kreatin-Kinase durch das dipolare Lösungsmittel hinweist. Jedoch ist im Falle der Negativkontrolle nur eine sehr geringe Beeinflussung gegenüber der Hintergrundaktivität feststellbar, so dass die deutlichen Veränderungen der MCK-Aktivität nach Zugabe bestimmter LOPAC-Substanzen (siehe Abbildung 42, rote und grüne Markierungen) nicht nur auf das Vorhandensein des DMSO zurückzuführen sind. Jedoch sind die gemessenen Unterschiede in der Positivkontrolle deutlich größer. Nachdem alle Platten gemessen wurden, erfolgte eine Auswertung der Messwerte durch Berechnung des Anstiegs der MCK-Aktivität nach Zugabe der verschiedenen Stoffe gegenüber den durchschnittlichen Messwerten der Negativkontrollen jeder Mikrotiterplatte. Als Ergebnis dieser Auswertungen konnten insgesamt 40 verschiedene Substanzen identifiziert werden, die in den C₂C₁₂ Zellen eine erhöhte MCK-Aktivität bewirken. Die Stoffe sowie ihre bereits annotierten Eigenschaften und Klassifizierung sind in Tabelle 5 angegeben (Zur Vereinheitlichung wurden in der Arbeit die englischen Original- bzw. Eigennamen beibehalten und kursiv gekennzeichnet). Die meisten der Substanzen (30 Stück) wurden bei einer eingesetzten Stoffkonzentration von 50 µmol identifiziert und weitere 12 bei 100 µmol. Dies ist vermutlich auf die erhöhte Konzentration des Lösungsmittels und damit erhöhten Hintergrundaktivitäten zurückzuführen (siehe Abbildung 42, untere Diagramme). Für

Fünf

der

Tabelle 5. Durch ein Screening der LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek konnten insgesamt 40 verschiedene Substanzen identifiziert werden, welche zu Veränderungen in der Muskel-Kreatin-Kinase Aktivität der C₂C₁₂ Zellen führen. Für jede der Substanzen ist jeweils die Nummer der LOPAC-Platte sowie die Position auf der Platte und die verwendete Konzentration angegeben. Das Verhältnis der gemessenen MCK-Aktivität gegenüber der durchschnittlichen Hintergrundaktivität ist in der Spalte „MCK“ angegeben. Falls zu den verwendeten Substanzen bereits Informationen zu der Stoffklasse, Wirkung und Selektivität bekannt waren, sind diese in der Tabelle angegeben. Farbig hinterlegte Stoffe konnten in beiden untersuchten Konzentrationen (50 µmol, 100 µmol) mit erhöhten MCK-Werten identifiziert werden.

Platte	Position	Menge	MCK	Bezeichnung	Stoffklasse	Enzym	Wirkung	Selektivität
13	G9	50µmol	552%	PD 98,059	Phosphorylierung	x	Inhibitor	MEK2
3	A4	50µmol	350%	(+)-Baclofen	GABA		Agonist	GABA-B
5	B4	50µmol	314%	CGS-12066A maleate	Phosphorylierung	x	Inhibitor	ROCK
3	C5	50µmol	279%	8-Bromo-cAMP sodium	zyklische Nucleotide	x	Aktivator	
3	F4	50µmol	239%	Betamethasone	Hormone			Glucocorticoid
3	C9	50µmol	213%	Carmustine	DNA		Interkalator	
10	B9	50µmol	204%	6-Methyl-2-(phenylethynyl)-pyridine hydrochloride	Glutamat		Antagonist	mGluR5
3	A9	50µmol	202%	Ciprofibrate	Transkription		Ligand	PPAR-alpha
3	F11	50µmol	202%	Corticosterone	Hormone			Glucocorticoid
3	G4	50µmol	196%	Buspirone hydrochloride	Serotonin		Agonist	5-HT1A
3	E3	50µmol	194%	BWB70C	Leukotriene	x	Inhibitor	5-lipoxygenase
8	G4	50µmol	185%	Hydrocortisone 21-hemisuccinate sodium	Hormone			Cortisol
1	B7	100µmol	174%	AC 915 oxalate	Opioid		Ligand	sigma1
14	E2	50µmol	172%	13-cis-retinoic acid	Transkription		Regulator	RAR-alpha, beta
3	B11	50µmol	168%	Choline bromide	Cholinergic	x	Substrate	Choline acetyltransferase
1	F4	100µmol	162%	(+)-Norepinephrine(+)-bitartrate salt	Adrenoceptor		Agonist	
1	G3	50µmol	160%	Arcaïne Sulfate	Glutamate		Antagonist	NMDA-Polyamine
2	A11	50µmol	156%	2,3-Butanedionemonoxime	K+ Channel		Blocker	ATP-sensitiv
9	C3	50µmol	156%	1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-3-methylpiperazine dihydrochloride	Phosphorylierung	x	Inhibitor	PKC
8	H6	50µmol	153%	HE-NECA	Adenosin		Agonist	A2
6	D2	50µmol	148%	Diethylenetriaminepentaacetic acid	Biochemie	x	Inhibitor	
8	D5	50µmol	145%	Hydrocortisone	Hormone			Cortisol
4	D4	50µmol	144%	9-cyclopentyladenine	zyklische Nucleotide	x	Inhibitor	Adenylate cyclase
6	C5	50µmol	144%	Dantrolene sodium	Intrazelluläres Calcium		Inhibitor	Release
1	D7	100µmol	139%	9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridinehydrochloride	Cholinergic	x	Inhibitor	Cholinesterase
6	H10	50µmol	136%	Etodolac	Prostaglandin	x	Inhibitor	COX
11	D4	50µmol	134%	Metolazone	Ionen Pumpe		Inhibitor	Na+/Cl-transporter
15	F10	50µmol	132%	Triamcinolone	Hormone		Agonist	Glucocorticoid
13	G9	100µmol	130%	PD 98,059	Phosphorylierung	x	Inhibitor	MEK2
14	C2	50µmol	126%	Retinoic acid	Apoptose	x	Aktivator	
13	B3	100µmol	122%	Putrescine dihydrochloride	Glutamat		Agonist	NMDA-Polyamine
7	C4	50µmol	120%	beta-Estradiol	Hormone			Estrogen
3	B9	100µmol	118%	6-Chloromelatonin	Melatonin		Agonist	
6	F10	50µmol	116%	Vanillic acid diethylamide	Vanilloid		Agonist	
2	B11	50µmol	112%	SB 222200	Tachykinin		Antagonist	NK3
6	H10	100µmol	110%	Etodolac	Prostaglandin	x	Inhibitor	COX
7	H7	50µmol	110%	Fenoldopam bromide	Dopamin		Agonist	D1
15	G10	100µmol	110%	S(-)-Timolol maleate	Adrenoceptor		Antagonist	beta
3	C11	100µmol	108%	Ceramide	Phosphorylierung	x	Inhibitor	Diacylglycerol kinase
15	F10	100µmol	103%	Triamcinolone	Hormone		Agonist	Glucocorticoid
13	H7	100µmol	101%	N6-Phenyladenosine	Adenosin		Agonist	A1
3	B11	100µmol	101%	Choline bromide	Cholinergic	x	Substrate	Choline acetyltransferase
3	C5	100µmol	99%	8-Bromo-cAMP sodium	zyklische Nucleotide	x	Aktivator	
3	A9	100µmol	98%	Ciprofibrate	Transkription		Ligand	PPAR-alpha
2	A11	100µmol	98%	2,3-Butanedionemonoxime	K+ Channel		Blocker	ATP-sensitiv

Substanzen konnte sogar bei beiden verwendeten Konzentrationen eine Erhöhung der MCK-Aktivität nachgewiesen werden, wobei zwei Stoffe (*PD98,059* und *Triamincinolone*) jeweils MCK-Werte von über 100% zeigen. Die anderen drei Substanzen (*8-Bromo-cAMP sodium*, *Ciprofibrate* und *2,3-Butanedionemonoxime*) bewirken bei einer eingesetzten Konzentration von 100 μmol „rechnerisch“ keine Erhöhung, was jedoch auf die bereits erwähnte Beeinflussung der Negativkontrollen durch DMSO zurückzuführen ist. Im Diagramm zeigen die Stoffe gegenüber dem Hintergrund der anderen Substanzen jedoch auch einen leichten Anstieg der MCK-Aktivität (Abbildung 42, untere Diagramme und grüne Markierungen), der bei den anderen Substanzen im Schnitt unter 80% liegt.

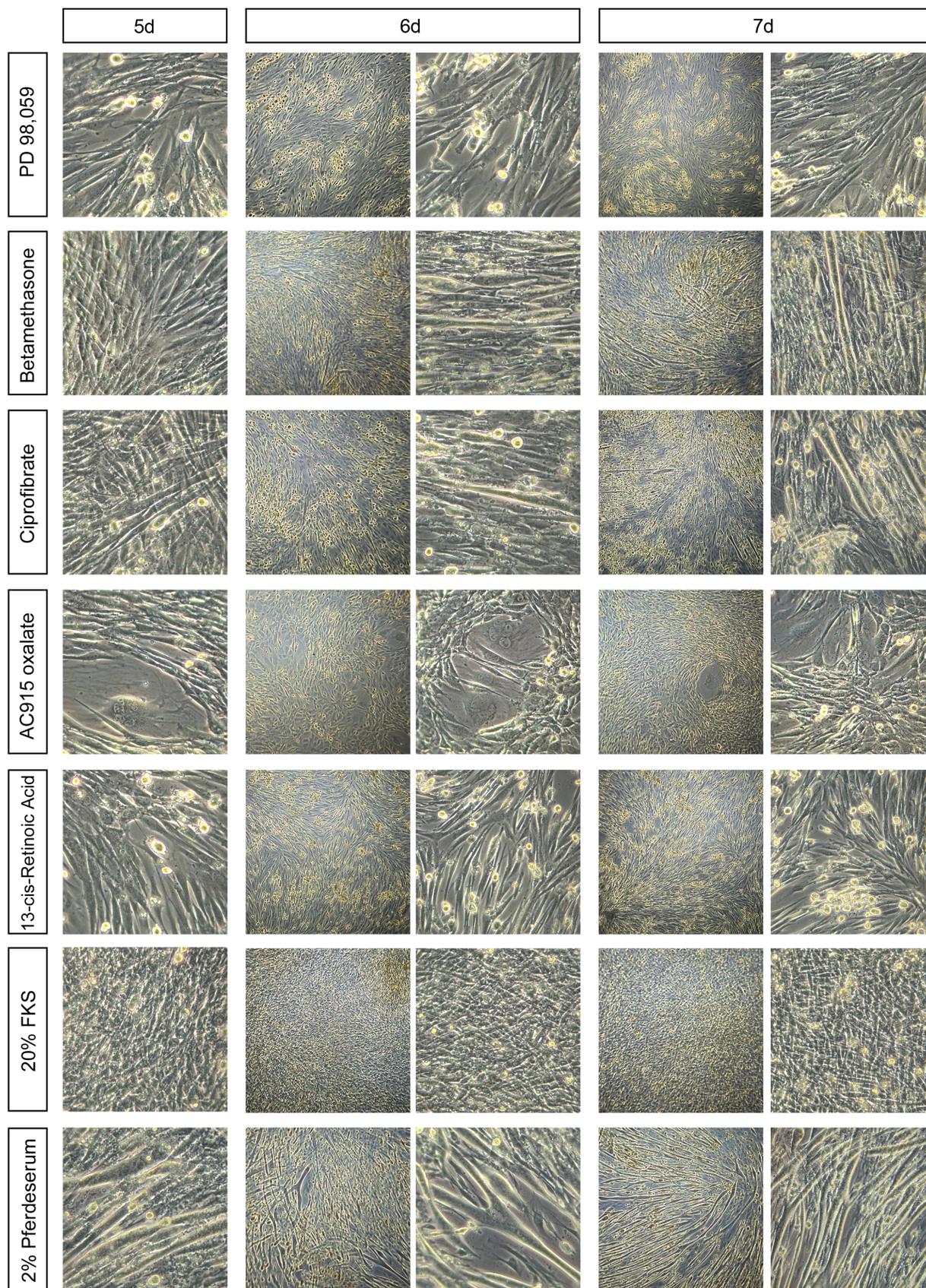
5.8.2. Überprüfung von Kandidaten der LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek mit potentiellm Einfluss auf die Differenzierung von Myoblasten

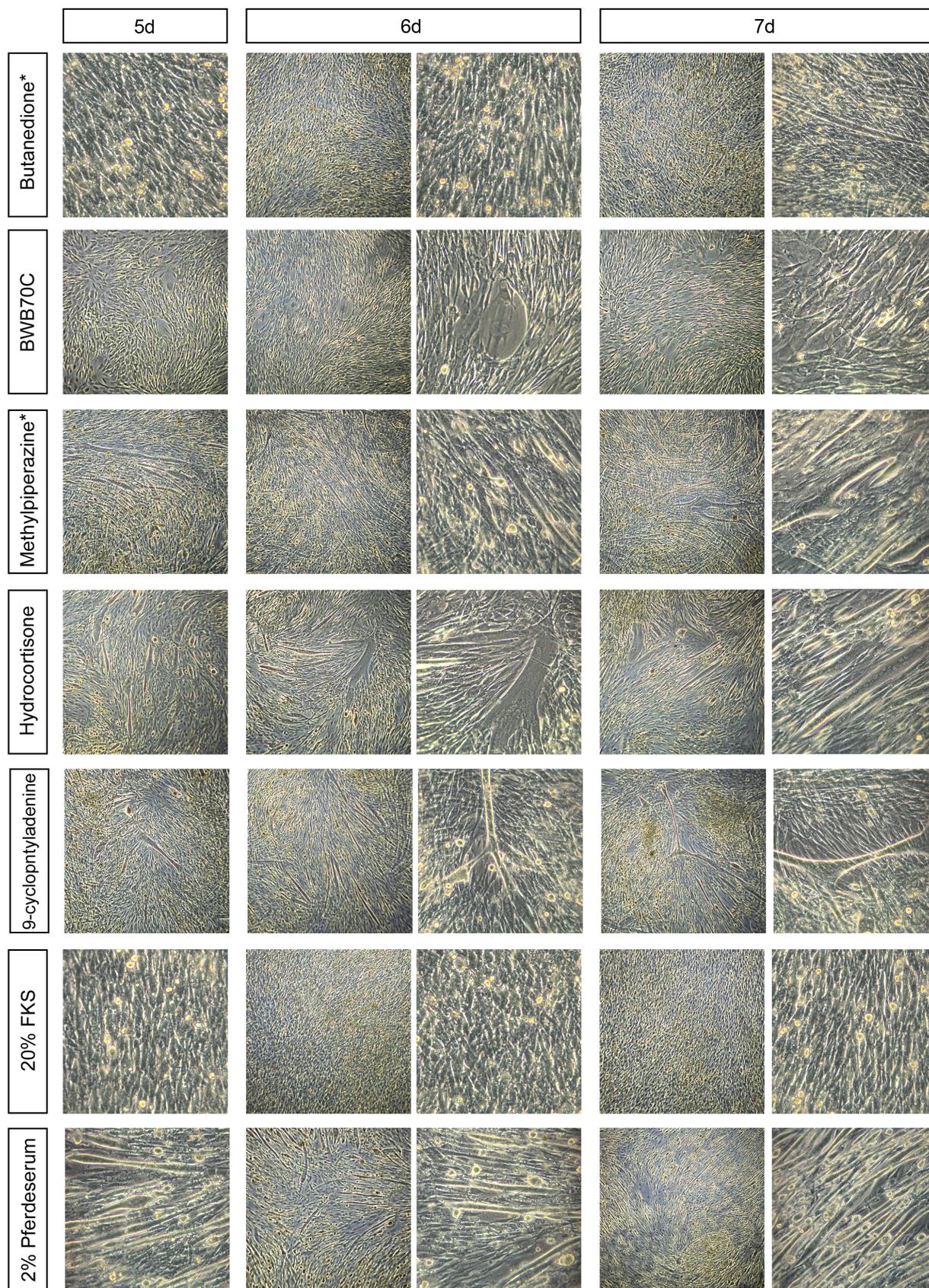
Die im Screening der LOPAC-Bibliothek identifizierten Substanzen wurden im nächsten Schritt noch einmal intensiver untersucht, denn es war davon auszugehen, dass sich, aufgrund des niedrigen Untersuchungsvolumens bzw. der geringen Oberfläche der Mikrotiterplatten und der teilweise starken Schwankungen in der MCK-Aktivität der Positiv- und Negativkontrollen, sich einige der positiv getesteten Substanzen als Artefakt herausstellen würden.

Für diesen Versuch wurden 6-Well Platten verwendet um eine größere Oberfläche zu gewährleisten, damit eine mögliche Synzytien- bzw. Myotubenbildung gut zu beobachten ist. Pro Well wurden jeweils 10.000 Zellen unter Proliferationsmedium (20% FKS) ausplattiert und am nächsten Tag die Behandlung mit den Substanzen begonnen. Dazu wurde zunächst für jeden Stoff eine 10mM Stammlösung in dem entsprechenden Lösungsmittel hergestellt und diese dann 1:200 (50 μmol) oder 1:100 (100 μmol) mit Proliferationsmedium verdünnt und zu den Zellen gegeben, wobei täglich ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Der Einfluss der Substanzen wurde durch fotografische Auswertung nach fünf, sechs und sieben Tagen Behandlung dokumentiert. In Abbildung 43 sind die Ergebnisse für 16 der insgesamt 33 untersuchten Stoffe, die eine morphologische Veränderung der C_2C_{12} Zellen auslösten, zusammengefasst. Nach Beendigung der optischen Auswertung wurden auch die Zellen aller Ansätze lysiert und eine erneute MCK-Messung durchgeführt (Abbildung 44).

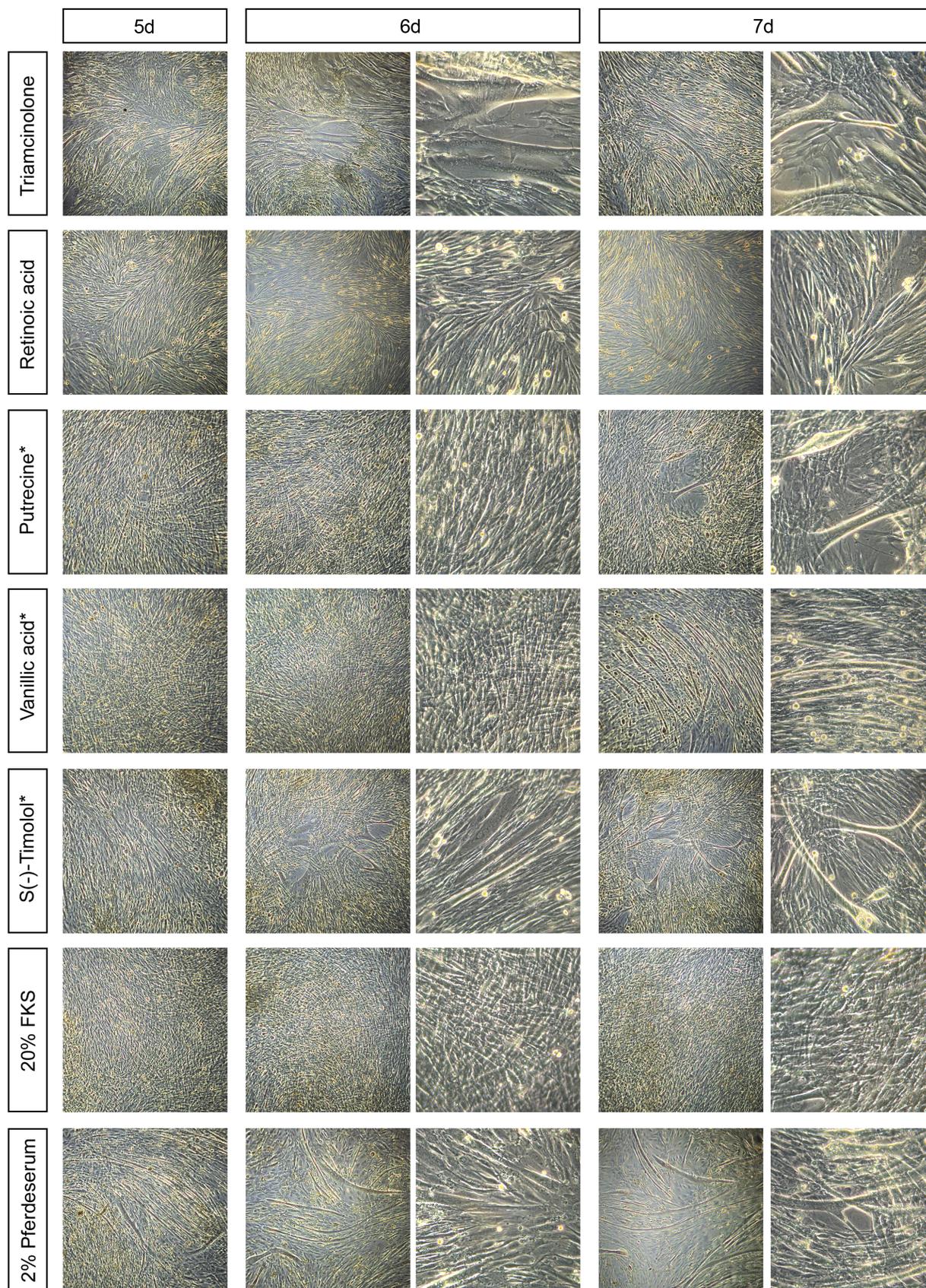
Wie bereits erwähnt, konnte nur für 16 Substanzen ein Einfluss auf die Morphologie der C_2C_{12} Zellen beobachtet werden. Für die restlichen 17 Substanzen waren entweder gar keine Veränderungen feststellbar, oder die Stoffe lösten, wie im Falle des *CGS-12066A maleate*, eine toxische Reaktion aus, die zum Tod der Zellen führte. Die Messung der MCK-Aktivität der einzelnen Versuchsansätze zeigte, dass 8 der 17 Substanzen Artefakte des ersten Screenings waren, da hier die Messwerte im Bereich der Negativkontrolle oder darunter lagen (Abbildung 44). Im Gegensatz dazu zeigten die Stoffe *Corticosterone*, *Ceramide*, *6-Methyl-2-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride*, *Beta-Estradiol*, *Hydrocortisone 21-hemisuccinate sodium*, *Diethylenetriaminepentaacetic acid*, *Dantrolene sodium*, *Etodolac* und *Fenoldopam bromide* eine deutlich erhöhte MCK-Aktivität, die in den meisten Fällen

sogar bis an die Messwerte der Positivkontrolle heranreicht, oder sogar größer ist. Möglicherweise wird





Butanedione* = 2,3-Butanedionmonoxime; Methylpiperazine* = 1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-3-methylpiperazine dihydrochloride



Putrescine* = Putrescine dihydrochloride; Vanillic acid* = Vanillic acid diethylamide; S(-)-Timolol* = S(-)-Timolol maleate

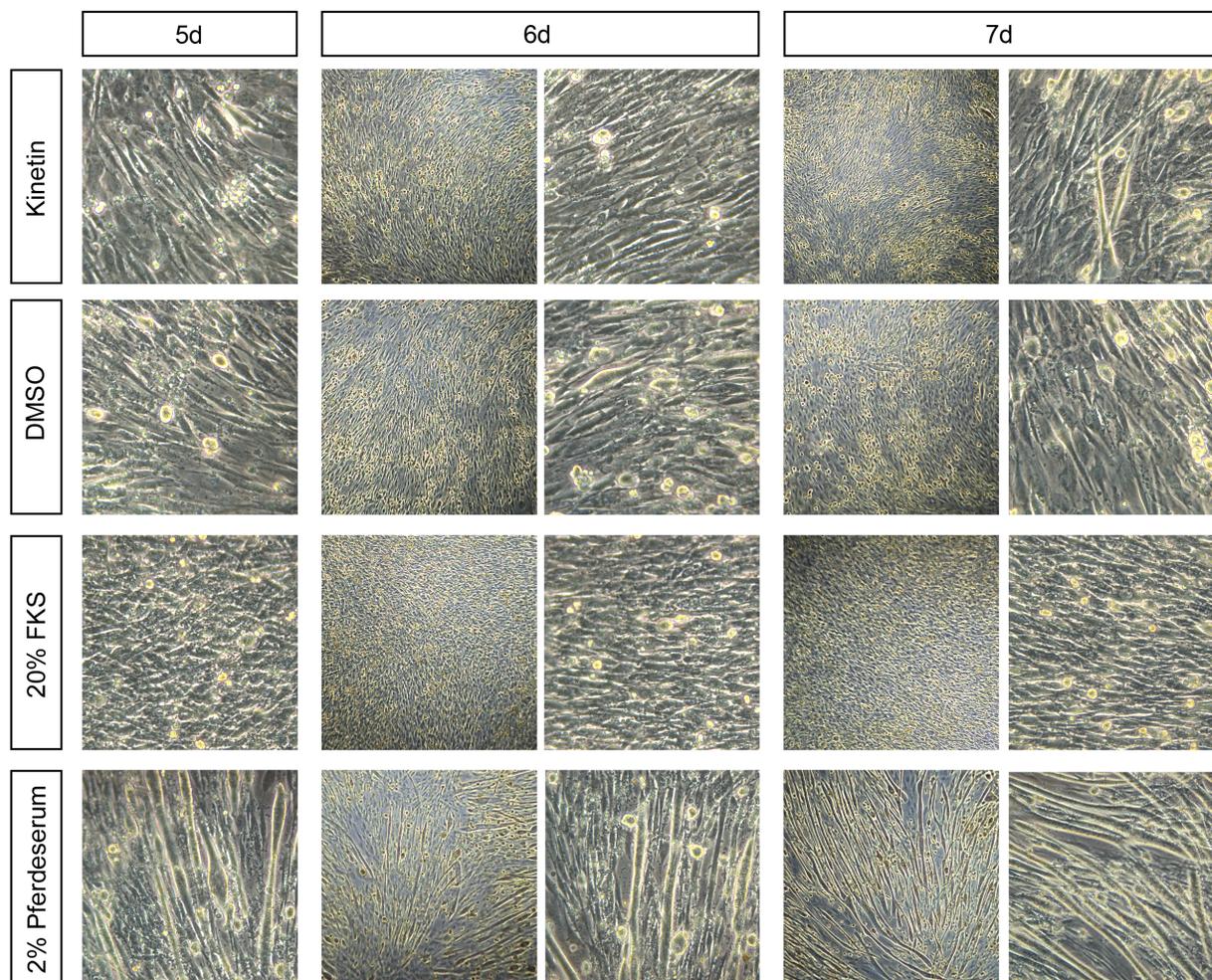


Abbildung 43. (und vorherige 3 Seiten) Zusammengefasste mikroskopische Auswertung der morphologischen Veränderungen von C_2C_{12} Myoblasten durch verschiedene Substanzen der LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek. Für Kontrollzwecke wurden zusätzlich Zellen ausschließlich mit Proliferationsmedium, Differenzierungsmedium sowie mit $50\mu\text{mol}$ DMSO inkubiert und die Veränderungen dokumentiert. Von den 40 im Screening identifizierten Substanzen wurden insgesamt 33 Stoffe für ein weiteres Screening auf 6-Well-Platten verwendet. 17 Substanzen zeigten dabei keine Auswirkungen auf die Morphologie (Carmustine; (+)-Baclofen; 8-Bromo-cAMP sodium; Ceramide; Acraine sulfate; 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridinehydrochloride; Corticosterone; Hydrocortisone 21-hemisuccinate sodium; 6-Methyl-2-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride; Buspirone hydrochloride; Etodolac; (+)-Norepinephrine (+)bitartate salt; Diethylenetriaminepentaacetic acid; Dantrolene sodium; Beta-Estradiol; Fenoldopam bromide), bzw. führten zum Absterben der Zellen (CGS-12066A maleate) und werden daher nicht in der Abbildung aufgeführt. Für 5 Substanzen (PD 98,059; AC915 oxalate; 13-cis-Retinoic Acid; BWB70C; Retinoic Acid) konnten morphologische Veränderungen der C_2C_{12} Zellen beobachtet werden, welche jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit auf das, als Lösungsmittel verwendete, DMSO zurückzuführen sind (siehe DMSO-Kontrolle) oder toxischen Ursprungs sind. Für die restlichen 11 getesteten Stoffe konnten die Bildung von Synzytien beobachtet werden, wobei im Falle von 8 Substanzen (Ciprofibrate; 2,3-Butanedionemonoxime; Hydrocortisone; Kinetin; 1-(5-Isoquinolinylnsulfonyl)-3-methylpiperazine dihydrochloride; 9-cyclopentyladenine; Putrescine dihydrochloride; Vanillic acid diethylamide) nur eine geringe Anzahl an Myotuben gefunden werden konnten. Nach Behandlung mit Betamethasone, Triamcinolone und S(-)-Timolol maleate zeigte sich dagegen eine terminale Differenzierung der C_2C_{12} Zellen, die mit der Positivkontrolle qualitativ und quantitativ vergleichbar war.

bei diesen Stoffen der MCK-Signalweg aktiviert, ohne weitere für die terminale Differenzierung wichtige Signalwege oder Prozesse mit einzubeziehen. Es ist auch denkbar, dass die Steigerung der MCK-Aktivität nur ein sekundärer Effekt ist, der aufgrund der toxischen oder regulatorischen Eigenschaften der untersuchten Stoffe ausgelöst wird.

Von den 16 Substanzen, die eine Änderung der Morphologie auslösen, zeigen 8 Stoffe nach 7-tägiger Inkubation eine vereinzelt Bildung von Synzytien (Abbildung 43; *Ciprofibrate*, *2,3-Butanedione-monoxime*, *Hydrocortisone*, *Kinetin*, *1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-3-methylpiperazine dihydrochloride*, *9-cyclopentyladenine*, *Putrescine dihydrochloride* und *Vanillic acid diethylamide*), die morphologisch mit den Myotuben der Positivkontrolle identisch sind. Alle diese Stoffe führen auch zu einem deutlichen Anstieg der MCK-Aktivität in den C_2C_{12} Zellen. Lediglich das *2,3-Butanedionemonoxime* zeigt nur einen geringen Anstieg des MCK-Werts, welcher jedoch eindeutig noch über dem Messwert der

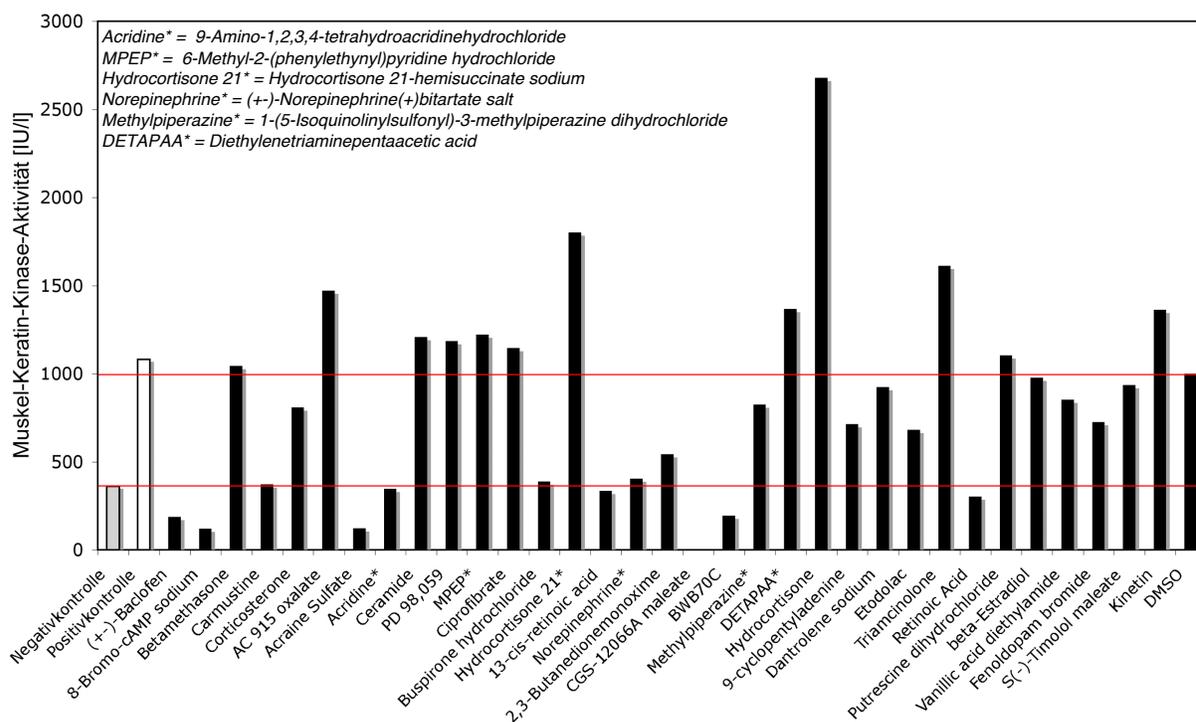


Abbildung 44. Auswertung der Muskel-Keratin-Kinase-Aktivität der C_2C_{12} Zellen nach Behandlung mit ausgewählten Substanzen der LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek. Die durchschnittlichen Werte der Positivkontrolle (Behandlung mit 2% Pferdeserum; n=6) und der Negativkontrolle (Behandlung mit 20% FKS; n=6) wurden als graue bzw. weiße Balken eingezeichnet. Die C_2C_{12} Zellen wurden in 6-Well-Platten für 7 Tage mit den 33 im ersten Screening identifizierten Substanzen inkubiert, anschließend lysiert und die MCK-Aktivität gemessen. 12 der getesteten Substanzen zeigten Messwerte, die im Bereich der Negativkontrolle (ohne Substanzzugabe) liegen, während die restlichen 21 Stoffe zu einem Anstieg der Messwerte führten. Besonders stark ist dabei die Erhöhung bei AC 915 oxalate, Triamcinolone, Hydrocortisone und Hydrocortisone 21 hemisuccinate sodium. Zur Kontrolle der Spezifität der Ergebnisse wurde zusätzlich ein Ansatz, der ausschließlich mit 50 μ mol DMSO behandelt wurde, gemessen. Auch hier zeigt sich ein Anstieg der MCK-Aktivität, was auf einen Einfluss des Lösungsmittels schließen lässt. Zusammen mit den Beobachtungen aus Abbildung 43 kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um einen Sekundäreffekt handelt. Zur besseren

Visualisierung wurde der durchschnittliche Bereich der Negativkontrollen durch rote Balken gekennzeichnet.

Negativkontrolle liegt (Abbildung 44). Einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die terminale Differenzierung der C₂C₁₂ Myoblasten haben die Stoffe *Betamethasone*, *Triamcinolone* und *S(-)-Timolol maleate*, welche eine deutliche Myotubenbildung auslösen, die in ihrer Intensität im Bereich der Positivkontrolle liegen. Auch die gemessenen MCK-Werte der Zellen nach Behandlung mit diesen Stoffen deuten auf den Prozess der terminalen Differenzierung hin, da die Messwerte für *Betamethasone* und *S(-)-Timolol maleate* den Werten der Positivkontrolle entsprechen und die MCK-Aktivität nach Zugabe von *Triamcinolone* sogar um etwa 1/3 gegenüber dem Kontrollversuch mit 20% FKS erhöht ist (Abbildung 44). Um einen unspezifischen Effekt des im ersten Screening verwendeten DMSO als Lösungsmittel zu untersuchen bzw. auszuschließen, wurden in diesem Versuchsansatz auch Zellen mit 50 µmol DMSO behandelt und dokumentiert. Die MCK-Werte nach dieser Behandlung zeigen tatsächlich einen Anstieg der MCK-Aktivität, die im Bereich der Positivkontrolle liegt. Da bereits bekannt ist, dass eine Behandlung mit DMSO verschiedenste zelluläre Reaktionen auslöst, kann davon ausgegangen werden, dass der Anstieg der MCK-Werte auf einen sekundären Effekt zurückzuführen sind. Dafür spricht auch die Tatsache, dass während der DMSO-Behandlung keine Bildung von Synzytien zu beobachten war. Zwar zeigen die Zellen leichte morphologische Veränderungen gegenüber der Negativkontrolle, diese scheinen jedoch aufgrund einer veränderten Proliferation bzw. einer erhöhten Apoptoserate zu entstehen (Abbildung 43). Eine ähnliche Morphologie der Zellen zeigt sich auch nach Behandlung mit *PD 98,059*, *AC915 oxalate*, *13-cis-Retinoic Acid*, *BWB70C* und *Retinoic Acid*. Es ist zu vermuten, dass die ausgelösten Effekte auf das als Lösungsmittel verwendete DMSO zurückzuführen sind. Jedoch lässt sich durch einen Vergleich mit den gemessenen MCK-Werten nur für das *PD 98,059* eine Beeinflussung durch das DMSO nachweisen, denn 1.) wurde für das *AC915 oxalate* in Wasser gelöst und 2.) lässt sich für die drei anderen Stoffe trotz der morphologischen Veränderungen kein Anstieg der MCK-Aktivität nachweisen (Abbildung 44). Somit ist anzunehmen, dass *AC915 oxalate*, *13-cis-Retinoic Acid*, *BWB70C* und *Retinoic Acid* ebenfalls Effekte innerhalb der C₂C₁₂ Zellen auslösen, die jedoch nicht in einer Differenzierung zu Myotuben resultieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit Hilfe des etablierten Screenings aus einer 1280 Substanzen umfassenden Stoffbibliothek zunächst 40 Kandidaten identifiziert werden konnten, die einen Einfluss auf die terminale Differenzierung der C₂C₁₂ Myoblasten vermuten ließen. Durch eine weitere Untersuchung der Kandidaten konnte für insgesamt 11 Stoffe tatsächlich eine Bildung von Synzytien unter Proliferationsbedingungen gezeigt werden, wobei die Quantität und Qualität der Differenzierung sehr unterschiedlich war. Um zu überprüfen, ob es sich bei den beobachteten Synzytien tatsächlich um Myotuben handelt, sollte in einem weiteren Versuch ein Nachweis durch einen muskelspezifischen Antikörper erfolgen.

5.8.2.1. Nachweis der terminalen Differenzierung durch immunhistochemische Anfärbung mit dem MF20 Antikörper

Alle Substanzen, die im zweiten, mikroskopischen Screening (Abbildung 43) morphologische Veränderungen in den C₂C₁₂ Zellkulturen auslösten bzw. zu einer Synzytienbildung führten, wurden in diesem Versuch nochmals untersucht. Mit Hilfe des skelettmuskelspezifischen MF20 Antikörpers, der die Myosin schwere Kette detektiert, sollte der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei den beobachteten Zellfusionen tatsächlich um Myotuben handelt. Dafür wurden die Zellen auf Objektträger-Kammern kultiviert und mit insgesamt 15 Substanzen behandelt [PD 98,059; *Betamethasone*; *Ciprofibrate*; *AC915 oxalate*; *13-cis-Retinoic Acid*; *2,3-Butanedionemonoxime*; *1-(5-Isoquinolinylnyl-sulfonyl)-3-methylpiperazine dihydrochloride*; *Hydrocortisone*; *9-cyclopentyladenine*; *Triamcinolone*; *Retinoic Acid*; *Putrescine dihydrochloride*; *Vanillic acid diethylamide*; *S(-)-Timolol*; *Kinetin*], die entsprechend der ermittelten Wirkungskonzentration in 20% FKS Proliferationsmedium gelöst wurden. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Zellen ausschließlich mit Proliferationsmedium, mit Differenzierungsmedium (2% Pferdeserum) sowie mit DMSO, das für einige Substanzen als Lösungsmittel verwendet wurde, inkubiert. Während der 7tägigen Behandlung erfolgte täglich ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden anschließend mit PFA fixiert und über Nacht mit einem monoklonalen MF20 Antikörper inkubiert. Für die Detektion des Erstantikörpers wurde ein fluoreszenz-markierter Anti-Maus Antikörper der Firma Invitrogen (*Alexa 594 anti-mouse*) verwendet. Zur besseren Visualisierung der Zellen bzw. Synzytien erfolgte zusätzlich eine DAPI-Färbung, die eine Detektion der Zellkerne durch Fluoreszenz erlaubt. Die Dokumentation der Antikörperfärbung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop und wurde in Abbildung 45 zusammengefasst. Jene Stoffe, die bereits in den vorangegangenen Versuchen eine Synzytienbildung bewirkten, zeigen erneut fusionierte Zellen. Dies sind *Betamethasone*, *Ciprofibrate*, *2,3-Butanedionemonoxime*, *1-(5-Isoquinolinylnylsulfonyl)-3-methylpiperazine dihydrochloride*, *Hydrocortisone*, *9-cyclopentyladenine*, *Triamcinolone*, *Putrescine dihydrochloride*, *Vanillic acid diethylamide*, *S(-)-Timolol* und *Kinetin*. Gegenüber den Vorversuchen, ist

Abbildung 45. (nächste Seite) Die immunhistochemische Auswertung der morphologischen Veränderungen von C₂C₁₂ Myoblasten durch ausgewählte Substanzen der LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek. Die C₂C₁₂ Zellen wurden unter Proliferationsbedingungen (20% FKS) für 7 Tage mit den niedermolekularen Stoffen inkubiert. Für Kontrollzwecke erfolgte eine zusätzliche Behandlung ausschließlich mit Proliferationsmedium, mit Differenzierungsmedium (2% Pferdeserum) sowie mit 50µmol DMSO, das als Lösungsmittel für die Substanzen genutzt wurde. Die immunhistochemische Anfärbung erfolgte mit dem MF20 Antikörper (Myosin, schwere Kette) und einem fluoreszenz-markierter Zweitantikörper (Alexa 594) sowie einer DAPI Färbung der Zellkerne. Während in der Negativkontrolle und nach der Inkubation mit DMSO keine spezifische Anfärbung beobachtet werden konnte, zeigen die Zellen nach Behandlung mit *Betamethasone*; *Ciprofibrate*; *2,3-Butan-edionemonoxime*; *1-(5-Isoquinolinylnylsulfonyl)-3-methylpiperazine dihydrochloride*; *Hydrocortisone*; *9-cyclopentyladenine*; *Triamcinolone*; *Putrescine dihydrochloride*; *Vanillic acid diethylamide*; *S(-)-Timolol maleate* und *Kinetin* eine spezifische Reaktion in den gebildeten Synzytien, die auch in der Positivkontrolle erfolgt. Da der MF20 Antikörper ausschließlich an das

skelettmuskelspezifische Myosin bindet, muss es sich bei den gefärbten Synzytien folglich um Myotuben handeln. Butanedione = 2,3-Butanedionmonoxime; Methylpiperazine* = 1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-3-methylpiperazine dihydro-chloride; Putrescine* = Putrescine dihydrochloride; Vanillic acid* = Vanillic acid diethylamide; S(-)-Timolol* = S(-)-Timolol maleate*

	Hellfeld	DAPI / MF20	Kombination	Hellfeld	DAPI / MF20	Kombination	
PD 98,059							Triamcinolone
Betamethasone							Retinoic acid
Ciprofibrate							Putrescine*
AC915 oxalate							Vanillic acid*
13-cis-Retinoic Acid							S(-)-Timolol*
Butanedione*							Kinetin
Methylpiperazine*							DMSO
Hydrocortisone							20% FKS
9-cycloptyladenine							2% Piferdeseum

Tabelle 6. Zusammengefasste Darstellung der Ergebnisse aller Screenings der LOPAC¹²⁸⁰ Stoffbibliothek auf Substanzen mit muskeldifferenzierungsfördernden Eigenschaften. Die Erstellung der Tabelle erfolgte anhand der Stärke der Muskel-Kreatin-Kinase (MCK) Aktivität (Spalte „MCK Messung“; +++, MCK-Aktivität > 200%; ++, MCK-Aktivität > 150%; +, MCK-Aktivität > 100%) sowie durch Auszählung der Synzytien/Myotuben pro 3 zufällig ausgewählten mikroskopischen Bildausschnitten (Spalte „Mikroskopische Auswertung“ und „Antikörperfärbung“; +++, Anzahl Synzytien > 100; ++, Anzahl Synzytien > 50; +, Anzahl Synzytien > 1; negativ, Anzahl Synzytien < 1; n.n., nicht untersucht). Erfolgte im gewählten Bildausschnitt keine Bildung von Synzytien/Myotuben, wurden stattdessen die entsprechenden Beobachtungen in der Tabelle angegeben.

Substanz	MCK Messung	mikroskopische Auswertung	Antikörperfärbung
PD 98,059	+++	Morphologie	negativ
(+)-Baclofen	+++	keine Veränderung	n.n.
CGS-12066A maleate	+++	Zelltod	n.n.
8-Bromo-cAMP sodium	+++	keine Veränderung	n.n.
Betamethasone	+++	+++	+++
Carmustine	+++	keine Veränderung	n.n.
6-Methyl-2-(phenylethynyl)-pyridine hydrochloride	+++	keine Veränderung	n.n.
Ciprofibrate	+++	++	+
Corticosterone	+++	keine Veränderung	n.n.
Buspiron hydrochloride	++	keine Veränderung	n.n.
BWB70C	++	Morphologie	n.n.
Hydrocortisone 21-hemisuccinate sodium	++	keine Veränderung	n.n.
AC 915 oxalate	++	Morphologie	negativ
13-cis-retinoic acid	++	Morphologie	negativ
Choline bromide	++	n.n.	n.n.
(+)-Norepinephrine(+)bitartrate salt	++	keine Veränderung	n.n.
Arcaïne Sulfate	++	keine Veränderung	n.n.
2,3-Butanedionemonoxime	++	+	++
1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-3-methylpiperazine dihydrochloride	++	+++	+++
HE-NECA	++	n.n.	n.n.
Diethylenetriaminepentaacetic acid	+	keine Veränderung	n.n.
Hydrocortisone	+	++	++
9-cyclopentyladenine	+	++	++
Dantrolene sodium	+	keine Veränderung	n.n.
9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridinehydrochloride	+	keine Veränderung	n.n.
Etodolac	+	keine Veränderung	n.n.
Metolazone	+	n.n.	n.n.
Triamcinolone	+	+++	++
Retinoic acid	+	Morphologie	negativ
Putrescine dihydrochloride	+	++	+
beta-Estradiol	+	keine Veränderung	n.n.
6-Chloromelatonin	+	n.n.	n.n.
Vanillic acid diethylamide	+	+++	++
SB 222200	+	n.n.	n.n.
Fenoldopam bromide	+	keine Veränderung	n.n.
S(-)-Timolol maleate	+	++	++
Ceramide	+	keine Veränderung	n.n.
N6-Phenyladenosine	+	n.n.	n.n.
Choline bromide	+	n.n.	n.n.

die Anzahl der beobachteten Synzytien zwar etwas geringer; jedoch zeigt auch die Positivkontrolle eine geringere Differenzierungsrate. Möglicherweise ist dies jedoch auf die abweichende Beschichtung der Objektträger-Kammern zurückzuführen, die zu einer generell schlechteren Differenzierung der C₂C₁₂ Zellen führt.

Die Ergebnisse der MF20 Antikörperfärbung bestätigen die Beobachtungen der vorherigen Untersuchungen, wonach die Zugabe bestimmter niedermolekularer Stoffe zu einer Einleitung der terminalen Differenzierung von C₂C₁₂ Myoblasten führt. Der immunhistochemische Nachweis der schweren Kette des Myosins in den gebildeten Synzytien zeigt ferner, dass es sich dabei tatsächlich um Myotuben handelt. Die festgestellten höheren Muskel-Keratinkinase Aktivitäten in den entsprechenden Zellsaten unterstützen diese Beobachtungen zusätzlich. Zusammenfassend wurden die Ergebnisse der einzelnen Screeningschritte in Tabelle 6 noch einmal gegenübergestellt und alle Substanzen mit einem nachweisbaren Einfluss auf die terminale Differenzierung der Myoblastenzelllinie C₂C₁₂ zusätzlich hervorgehoben. Die Klassifizierung der einzelnen Stoffe erfolgte durch die in der enzymatischen Messung ermittelten MCK-Aktivitäten sowie durch eine Auszählung der gebildeten Synzytien. Dazu wurden pro Ansatz 3 zufällige Bildausschnitte gewählt und anschließend die Anzahl aller mehrkernigen Zellen ermittelt.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten durch verschiedene molekularbiologische und biochemische Ansätze neue Erkenntnisse über die Skelettmuskelentwicklung und -regeneration in Vertebraten gewonnen werden, bzw. Grundlagen für neue Untersuchungsmöglichkeiten geschaffen werden. Durch die Etablierung von Mausmodellen kann z.B. die Funktion von Proteinen innerhalb ihrer natürlichen und geordneten Umgebung untersucht werden, während durch biochemische Untersuchungen *in vitro* genaue Erkenntnisse über Bindungs- und Interaktionseigenschaften der Proteine gewonnen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden nach diesen Prinzipien zwei verschiedene muskel-spezifische Gene der Maus untersucht. Um die genaue Funktion, des in den Satellitenzellen exprimierten, und somit für die Muskelregeneration entscheidenden Transkriptionsfaktors *Pax7* zu ermitteln, wurde eine Mauslinie generiert, die eine zeitliche und gewebespezifische Inaktivierung des Gens erlaubt. Eine vergleichbare Mauslinie wurde auch für das *mVITO-2* etabliert, dem Mitglied einer neuen Genfamilie muskelspezifisch exprimierter Gene, welche in dieser Dissertation genetisch und biochemisch untersucht wurden und als Cofaktoren der TEF-vermittelten Transkription identifiziert werden konnten.

Eine weitere Möglichkeit, die Prozesse der Muskelentwicklung besser zu verstehen und möglicherweise daraus therapeutische Ansätze zu entwickeln, war das im letzten Teil der Arbeit durchgeführte Screening einer Stoffbibliothek mit niedermolekularen Substanzen. Ziel war es, Stoffe zu identifizieren, welche die terminale Differenzierung von C₂C₁₂ Myoblasten fördern bzw. hemmen, um somit Einblicke in die molekularen Kontrollmechanismen dieses entscheidenden Prozesses zu gewinnen.

6.1. Der konditionelle *Knock Out* von *Pax7* erlaubt eine gezielte Untersuchung des letalen postnatalen Phänotyps der *Pax7^{LacZ}* Nullmutation und eine genaue Analyse der Bedeutung von *Pax7* während der Muskelentwicklung und Regeneration

Die etablierte Mauslinie *Pax7cKO* ermöglicht ein zell- und entwicklungsspezifisches Ausschalten der *Pax7* Expression. Um dies zu gewährleisten, müssen die veränderten homozygoten Mäuse eine korrekte Prozessierung sowie eine, zur Wildtypsituation vergleichbare, Transkription und Translation aufweisen. Zwar war es nicht möglich durch einen Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen *Pax7* den direkten Nachweis des Proteins in den Wildtyp-Mäusen und die Verringerung der Expression in den Mutanten zu führen, jedoch konnte durch eine RT-PCR die korrekte Prozessierung der prä-mRNA nachgewiesen werden. Die hetero- und homozygoten Mäuse der *Pax7cKO* Linie zeigen keine signifikante Veränderung in der Expression in allen Exonabschnitten der *Pax7* cDNA (Abbildung 19). Zudem konnten auch keine generellen Beeinträchtigungen lebensnotwendiger Körperfunktionen, des Zuchtverhaltens oder der Lebensdauer gegenüber den Wildtyp-Geschwistertieren beobachtet

werden (Abbildung 18A). Da die Expression von *Pax7* im adulten Organismus auf die ruhenden und frühen aktivierten Satellitenzellen beschränkt ist, und allgemein angenommen wird, dass die Präsenz von *Pax7* für die Spezifizierung und Aufrechterhaltung der Satellitenzelllinie notwendig ist (Seale *et al.* 2000; Oustanina *et al.* 2004), wurde als weiterer Nachweis der korrekten Expression und Prozessierung von *Pax7* die Anzahl und die statistische Verteilung der Satellitenzellen in den Muskeln überprüft. Auch hier zeigte sich zwischen den Geschwistertieren der *Pax7cKO* Linie kein signifikanter Unterschied, weder in der totalen Anzahl der Satellitenzellen, noch in der Verteilung der Zellen pro Myotube (Abbildung 18B). Aus diesen Beobachtungen kann somit geschlossen werden, dass kein erkennbarer Unterschied zwischen dem Phänotyp der *Pax7cKO* Tiere und Wildtyp-Mäusen besteht und diese Linie folglich zur konditionellen Ausschaltung von *Pax7* verwendet werden kann.

6.1.1. Die Cre-Vermittelte Rekombination im *Pax7cKO* Locus ermöglicht die funktionelle Ausschaltung der *Pax7* Expression

Durch Verpaarung der Ausgangslinie *Pax7cKO^{Neo}* mit Mäusen, welche die Cre-Rekombinase transient in einem sehr frühen Embryonalstadium exprimieren, wurde die *Pax7KO* Mauslinie generiert. Diese Mauslinie diente vorrangig der Kontrolle der korrekten Funktionsweise der eingeführten LoxP Elemente. Nach erfolgter Cre-vermittelter Rekombination sollten die ersten drei Exone der *Pax7* cDNA deletiert werden und eine native Funktion des Proteins, durch Fehlen der in diesen Exonen lokalisierten „Paired Box“ Domäne, nicht mehr möglich sein (Jostes *et al.* 1990; Chalepakis *et al.* 1994; Epstein *et al.* 1994). Tatsächlich zeigen die Mäuse deutliche Auffälligkeiten, die im Phänotyp den bereits beschriebenen konstitutiven *Pax7^{LacZ} Knock In* Mäusen ähneln (Mansouri *et al.* 1996b; Seale *et al.* 2000). Die homozygoten Tiere der *Pax7KO* Linie zeigen analog zur konstitutiven Nullmutation ein Defizit in der postnatalen Entwicklung, die sich deutlich in der unterschiedlichen Körpergröße der Geschwistertiere widerspiegelt (Abbildung 15A). Aufgrund der Tatsache, dass 93% aller homozygoten Nachkommen des konstitutiven *Pax7 Knock Out* innerhalb der ersten 3 Wochen nach der Geburt sterben, wurde von Seale und Mitarbeitern der Phänotyp der Mäuse mit einem Alter von 7 bzw. 14 Tagen dokumentiert. Hier zeigte sich zu Beginn der Untersuchungen eine Reduktion des Körpergewichts um ca. 50%, die im Laufe der weiteren Entwicklung stetig zunimmt und nach 14 Tagen bereits 67% beträgt. Die homozygoten Mutanten der *Pax7KO* Mauslinie zeigten ebenfalls am Tag 7 nach der Geburt einen deutlichen Unterschied im Körpergewicht gegenüber den heterozygoten oder Wildtyp-Geschwistertieren, der mit über 60% jedoch etwas stärker ausgeprägt war, als von Seale und Mitarbeitern beschrieben. Im Laufe der weiteren Messungen blieb dieser Unterschied - im Gegensatz zu den Beobachtungen von Seale *et al.* - weitestgehend konstant. Erst ab Tag 17 erfolgte eine deutliche Vergrößerung der Unterschiede, resultierend aus einer beginnenden negativen Wachstumskurve. Es bleibt somit festzuhalten, dass trotz einiger geringer Unterschiede in der frühen postnatalen Entwicklung zwischen den konditionellen *Knock Out* und konstitutiven *Knock In* Mutanten eine weitestgehende Übereinstimmung im Phänotyp existiert.

Ähnlich verhält es sich für die Existenz von Satellitenzellen an den Myotuben homozygoter Mutanten. Zwar wurden in vorangegangenen Untersuchungen der *Pax7^{LacZ} Knock In* Mäuse von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Beobachtungen über den Zeitpunkt des Verlusts der Satellitenzellen gemacht, jedoch konnte eindeutig gezeigt werden, dass nach der Geburt Satellitenzellen existieren, deren Anzahl während der postnatalen Entwicklung jedoch stetig abnimmt und spätestens 2 Monate nach der Geburt in einem vollständigen Fehlen der Zellen resultiert (Seale *et al.* 2000; Oustanina *et al.* 2004). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten homozygoten Mutanten der *Pax7KO* Linie zeigten mit einem Alter von 40 Tagen bereits einen fast vollständigen Verlust der Satellitenzellen. Interessanterweise weisen bereits die heterozygoten Tiere eine signifikante Reduktion der CD34-positiven Satellitenzellen, eine Ausbildung einer Kyphose und eine geringere Körpergröße gegenüber den Wildtyp Geschwistertieren auf. Eine solche Haploinsuffizienz wurde zwar bislang noch nicht beschrieben, jedoch weist auch die Wachstumskurve der *Pax7KO* Jungtiere ab Tag 16 einen beginnenden Unterschied im Körpergewicht zwischen den Wildtyp und heterozygoten Mutanten auf. Ob die Veränderungen des Körpergewichts jedoch tatsächlich eine direkte Auswirkung der *Pax7* Inaktivierung sind, oder nur indirekte Folge eines bislang nicht identifizierten Phänotyps, bleibt weiterhin unklar. Wie beim konstitutiven *LacZ Knock In* überleben einige Tiere das „kritische Alter“ von 3 Wochen und sind fähig, die anfänglichen Wachstumsdefizite im begrenzten Maße zu kompensieren. Vermutlich reichen die bei der Geburt noch vorhandenen Satellitenzellen aus, um ein relativ stabiles postnatales Muskelwachstum zu gewährleisten bis der Satellitenzellpool vollständig verbraucht ist. Da jedoch alle Mutanten anfangs die gleiche Anzahl an Satellitenzellen besitzen, müsste bei dieser Hypothese ein weiterer Faktor über das Überleben der homozygoten *Pax7* Mutanten entscheiden. Dies könnte beispielsweise auch der genetische Hintergrund der Mauslinie sein, denn auch im konstitutiven *Pax7^{LacZ} Knock In* ist die Überlebensfähigkeit der Mutanten von der Art der Rückkreuzung abhängig (Oustanina *et al.* 2004; Kuang *et al.* 2006). Nach mehrfacher Rückkreuzung in einen SV129 Hintergrund konnte die Anzahl an Tieren, die ein adultes Stadium erreichen, auf bis zu 10% gesteigert werden. Aus diesem Grund wurde mit den generierten *Pax7*-Linien ebenfalls mit der Rückkreuzung sowohl in einen SV129 und C57Bl/6 Hintergrund begonnen. Zum Zeitpunkt der Beendigung der Arbeit lag bereits die dritte Generation dieser Kreuzungen vor, so dass in naher Zukunft eine Auswertung über den Einfluss des Hintergrunds auf die Ausprägung des Phänotyps erfolgen kann. Darüber hinaus sollte mit diesen Tieren eine Wiederholung der in der Arbeit durchgeführten phänotypischen Analysen erfolgen, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die festgestellten Unterschiede im Phänotyp zwischen den konstitutiven und konditionellen *Knock Out* Mutanten auf einem noch ungleichmäßigen genetischen Hintergrund der konditionellen *Pax7* Mauslinien beruht. Ähnlich verhält es sich auch mit dem beobachteten abgeschwächten Phänotyp der hypomorphen *Pax7cKO^{Neo}* Linie, der trotz fehlender Deletion bereits Merkmale der *Pax7* Nullmutation aufweist (siehe Abschnitt 6.2.).

6.1.2. Die Aufklärung der Funktion von Pax7 während der neuronalen und embryonalen Entwicklung im Kontext des letalen Phänotyps kann durch die *Pax7cKO* Linie erfolgen

Vermutlich ist der genetische Hintergrund jedoch nicht der einzige bzw. der entscheidende Faktor für das Überleben der homozygoten Pax7 Mutanten, da auch nach Rückkreuzung in den SV129 Hintergrund nur ein geringer Anteil an Mäusen ein adultes Stadium erreicht (Kuang *et al.* 2006). Da Pax7 während der Embryonalentwicklung auch im Neuralrohr und in Zellen der Neuralleiste exprimiert wird, aus denen eine Reihe von verschiedenen Zelltypen - wie Neuronen und Gliazellen des peripheren Nervensystems sowie Melanozyten - hervorgehen, wurde bereits von Mansouri und Mitarbeitern vermutet, dass ein Fehlen von Pax7 in diesen Zellen für den frühzeitigen Tod der Tiere verantwortlich ist (Jostes *et al.* 1990; Mansouri *et al.* 1996b). Zwar erfolgt in den meisten Bereichen der Pax7 Expression ein kompensatorischer Effekt des Paralog *Pax3*, jedoch ist diese Überlappung nicht vollständig, wie von Mansouri und Mitarbeitern bereits für Teile des Rhombencephalons gezeigt werden konnte und zu cranio-fascialen Veränderungen der Mutanten führt (Mansouri *et al.* 1996b; Mansouri und Gruss 1998). Es könnte also vermutet werden, dass Pax7 auch für die korrekte Entwicklung von Derivaten der Neuralleiste benötigt wird und das Fehlen des Transkriptionsfaktors in diesen Strukturen für den letalen Phänotyp verantwortlich ist. Eine Untersuchung dieser Hypothese könnte mit Hilfe der konditionellen Pax7 Nullmutation erfolgen. Durch Verkreuzungen mit mesodermspezifischen Cre-Rekombinase Linien, die eine frühe Inaktivierung von Pax7 während der Embryonalentwicklung gewährleisten, könnte die Funktion von Pax7 ausschließlich im präsomitischen Mesoderm (PSM) und in den Somiten ausgeschaltet werden. Alle neuronalen Zellen und daraus abgeleiteten Strukturen werden von dieser Inaktivierung jedoch nicht betroffen, da diese während der Neurulation aus dem Ektoderm gebildet werden. Zwei Cre-Linien, die zu diesem Zweck eingesetzt werden können, sind die *msd:Cre* und die *T(s)::Cre*, die beide in der Arbeitsgruppe von Achim Gossler generiert wurden. Für die *T(s)::Cre* Linie wurde die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle von regulatorischen Elementen des *Brachyury* Gens gestellt. Dieses T-Box Gen ist im embryonalen Mesoderm (Primitivstreifen) aktiv und steuert dort die zelluläre Differenzierung. Mit Hilfe einer *ROSA-LacZ* Reportermaus konnte bereits die exklusive Expression der Cre-Rekombinase im PSM und in den Somiten nachgewiesen werden (Feller *et al.* 2008). Auch für die *msd:Cre* Linie wurde durch eine *Gtrosa26^{tm1Sor}* Reportermaus, die Expression der Cre-Rekombinase zwischen den Embryonalstadien E9.5 und E12.5 im paraxialen Mesoderm gezeigt werden (Ji *et al.* 2006). Mit Hilfe der beschriebenen Cre Linien könnte somit die Bedeutung von Pax7 für die nicht-mesodermale postnatale Entwicklung untersucht und möglicherweise der Grund für den frühzeitigen Tod der Jungtiere weiter eingegrenzt werden, da die cranio-fascialen Veränderungen - ausgelöst durch eine fehlende Expression von Pax7 im Rhombencephalon - nicht mehr auftreten sollten.

Durch eine zeitlich gesteuerte Pax7 Inaktivierung, nach Erreichen des Erwachsenenalters, könnte ein ähnlicher Ansatz zur Aufklärung dieser Frage erfolgen. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits mit der Konstruktion einer *Pax7 MerCreMer (Pax7^{MCM})* Mauslinie begonnen. Die Aktivität der Cre

Rekombinase wird in diesem Mausmodell durch zwei Mechanismen kontrolliert. Zum einen durch die native *Pax7* Expression, da die MerCreMer Kasette in den Translationsstart des *Pax7* Gens kloniert wurde, und zum zweiten durch die Zugabe eines selektiven Estrogenrezeptormodulators (Tamoxifen), der nach Translation der MerCreMer Kasette, die Translokation der Cre-Rekombinase in den Zellkern ermöglicht. Zwar ist mit diesem Modell eine Keimblatt-spezifische Ausschaltung nicht möglich, da die Cre Expression in allen *Pax7* positiven Zellen erfolgt, jedoch kann der frühe letale Phänotyp möglicherweise durch eine zeitlich verschobene Inaktivierung im frühen adulten Stadium umgangen und damit die Bedeutung von *Pax7* im adulten Organismus aufgeklärt werden. Zu erwarten wäre hier ebenfalls ein Ausbleiben der cranio-fascialen Fehlbildungen, da die Entwicklung dieser Strukturen in adulten Tieren bereits abgeschlossen ist. Im Gegensatz dazu, sollte der muskelspezifische Phänotyp - nach der gängigen Vorstellung der satellitenzellabhängigen Muskelregeneration - weiterhin erhalten bleiben, da eine *Pax7* Expression und damit die Inaktivierung in allen Satellitenzellen erfolgt (Seale *et al.* 2000). Ein *Rescue* des Muskel-Phänotyps wäre nur mit einer *Pax7*-unabhängigen Population von Stammzellen möglich, deren Existenz bereits von einigen Arbeitsgruppen postuliert worden ist. So wurde von Minasi und Mitarbeitern gezeigt, dass aus Blutgefäßen abgeleitete Stammzellen (Meso-Angioblasten) ebenfalls ein myogenes Potential besitzen und nach Injektion in die Blutbahn zur Reperatur von Muskeln befähigt sind (Minasi *et al.* 2002; Sampaolesi *et al.* 2003). Eine Bedeutung dieser Zellen während des normalen Muskelwachstums und Regeneration konnte aber bislang noch nicht gezeigt werden. Gegen eine Beteiligung dieser Zellen an der Skelettmuskelregeneration spricht jedoch auch die Tatsache, dass keine der bisherigen Untersuchungen am konstitutiven *Pax7^{LacZ}* *Knock In* einen Hinweis auf einen alternativen Regenerationsweg liefern konnte (Sherwood *et al.* 2004; Oustanina *et al.* 2004; Kuang *et al.* 2006).

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden im Zusammenhang mit Untersuchungen der Muskelregeneration in *Pax7* defizienten Mäusen, *Pax3*-positive Zellen identifiziert (Kassar-Duchossoy *et al.* 2005; Relaix *et al.* 2006; Horst *et al.* 2006; Kuang *et al.* 2006). Um genauer überprüfen zu können, welche Rolle dem Paralog *Pax3* bei der embryonalen Myogenese und der Regeneration im adulten Organismus zukommt, wurde bereits damit begonnen, die *Pax7cKO* Linie mit *Pax3^{Cre}* Mäusen zu verkreuzen. Die resultierenden Mäuse würden demnach in allen *Pax3*-positiven Zellen kein natives *Pax7* mehr bilden können. Mit diesem Modell kann zum einen überprüft werden, ob *Pax3*-positive Myoblasten tatsächlich existieren bzw. welche Bedeutung diesen Zellen während der adulten Muskelregeneration zukommt und darüber hinaus, wie weit die kompensatorische Wirkung von *Pax3* ausreicht, um *Pax7*-abhängige Prozesse weiter ablaufen zu lassen. Somit können alle Vorgänge identifiziert werden, die ausschließlich auf der Wirkung von *Pax7* positiven Zellen beruhen und auf diese Weise die zelluläre Wirkung des Transkriptionsfaktors weiter eingegrenzen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Entwicklung der Muskeln des Kopfes, da dort keine Expression von *Pax3* erfolgt und *Pax7* - im Gegensatz zu den restlichen Skelettmuskeln - erst nach den Faktoren Myf5 und MyoD (MRFs) gebildet wird (Horst *et al.* 2006). Das Fehlen von *Pax7* in diesen Bereichen scheint

zwar nicht essentiell für die Myogenese zu sein, da in den Pax7 Nullmutanten die Bildung der Kopfmuskulatur normal verläuft (Relaix *et al.* 2004; Noden und Francis-West 2006), obwohl die Muskelvorläuferzellen des Kopfes während der embryonalen Entwicklung, durch die Expression von Pax7 gekennzeichnet sind (Buckingham und Relaix 2007).

6.1.3. Der konditionelle Pax7 Knock Out erlaubt neue Einblicke in die Rolle der MRFs während der Muskelentwicklung und Regeneration

Die Aufklärung der Funktion der MRFs für die embryonale Myogenese ist jedoch auch für die restliche Skelettmuskulatur und insbesondere für die spätere satellitenspezifische Regeneration von großer Bedeutung. Ein besonderes Augenmerk liegt in diesem Kontext auch auf der Klärung der Hierarchie dieser Determinationsfaktoren im Bezug auf die Expression von Pax7 und Pax3. Die Bedeutung der MRFs für die embryonale Myogenese wurde bereits in verschiedenen Arbeiten untersucht, da diese Faktoren den Grundmechanismus der Skelettmuskelbildung darstellen. Im Gegensatz dazu sind nur wenige Erkenntnisse über die Funktion und Rolle der Faktoren in der Homöostase und Regeneration der adulten Muskulatur vorhanden. Mit Hilfe von Transkriptomanalysen nach einer Cardiotoxin-Schädigung konnte bereits die Induktion von MyoD und Myf6 nachgewiesen werden (Zhao und Hoffmann 2004), die auf eine Rolle der beiden Faktoren für die Aktivierung der Satellitenzellen hindeutet (Megeney *et al.* 1996; Nicolas *et al.* 1996). Daher soll, durch Verkreuzung der Pax7cKO Linie mit MyoD^{CreERT} Tieren, ein Mausmodell generiert werden, das eine Inaktivierung des Pax7 unter Kontrolle der MyoD Expression und zusätzlicher temporaler Applikation von Tamoxifen erlaubt. Nach den momentanen Erkenntnissen sollte bei Tamoxifenzugabe in adulten Mäusen nur eine Induktion der Cre-Rekombinase in aktivierten Satellitenzellen erfolgen. Demnach könnte mit Hilfe dieses Ansatzes die Frage geklärt werden, ob Pax7 ausschließlich für die Spezifizierung und Aufrechterhaltung des Satellitenzellstatus verantwortlich ist, oder auch noch über den Zustand der Aktivierung der Satellitenzellen hinaus benötigt wird. Dies könnte z.B. eine antiapoptotische Funktion während der Proliferationsphase der aktivierten Satellitenzellen sein (Relaix *et al.* 2006), oder aber die Aufrechterhaltung des Satellitenzellpools. Bislang wurde angenommen, dass ein Teil der aktivierten Satellitenzellen, anstatt die Expression von Pax7 zu verringern und anschließend zu differenzieren, ihre MyoD Aktivität verlieren und einen Reseve-ähnlichen Zustand annehmen (Zammit *et al.* 2004). Nach dieser Hypothese müsste in den MyoD^{CreERT}/Pax7cKO Mäusen ein ähnlicher Phänotyp, wie bei der konstitutiven Pax7^{LacZ} Linie beobachtet werden, da eine normale embryonale Myogenese und Anlage des Satellitenzellpools erfolgen sollte, sich dieser aber im Laufe der postnatalen Entwicklung sowie adulten Myogenese und Regeneration langsam erschöpft. Ob in diesem Zusammenhang auch die Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur beeinträchtigt ist, kann jedoch nur spekuliert werden, da - wie bereits erwähnt - noch nicht eindeutig geklärt ist, wie weit der Einfluss von Pax7 nach der Aktivierung der Satellitenzellen reicht und ob damit der Verlust von Pax7 zu diesem Zeitpunkt noch Auswirkungen auf die Regenerationsprozesse hat (Zammit *et al.* 2006). Fraglich ist dabei auch, ob das Zeitfenster zwischen beginnender MyoD Induktion in den aktivierten Satellitenzellen und der

abnehmenden Expression von *Pax7* groß genug ist, um einen Effekt auszulösen, da die notwendigen Rekombinationsereignisse mit einer zeitlichen Verzögerung stattfinden.

Eine weitere Hypothese der Satellitenzell-Erneuerung beruht auf der Expression eines weiteren MRF: *Myf5*. Durch *LacZ Knock In* Mauslinien im *Myf5* Locus war bereits seit längerem bekannt, dass ca. 90% der ruhenden Satellitenzellen auch *Myf5*-positiv sind (Beauchamp *et al.* 2000; Zammit *et al.* 2004). In einer kürzlichen Publikation von Kuang und Mitarbeitern konnte mit Hilfe von verschiedenen Reporterstämmen und Zeitrafferstudien gezeigt werden, dass 10% aller *Pax7*-positiven Satellitenzellen niemals *Myf5* exprimiert haben, jedoch über unterschiedlich gerichtete Zellteilungsvorgänge, sowohl *Myf5*-positive und *Myf5*-negative Subpopulationen, gebildet werden (Kuang *et al.* 2007). Die Autoren schließen aus diesen Beobachtungen, dass die *Myf5*-positiven Satellitenzellen einen bereits determinierten Pool von Muskel-Vorläuferzellen darstellen, der proliferiert und anschließend differenziert, während die *Myf5*-negative Population als Stammzellen fungieren und für die Aufrechterhaltung des Satellitenzellpools verantwortlich sind. Im Hintergrund dieser Ergebnisse wurde ebenfalls damit begonnen die *Pax7cKO* Mäuse mit der *Myf5^{Cre}* Linie zu verkreuzen (Tallquist *et al.* 2000). Nach der Hypothese von Kuang und Mitarbeitern dürfte die Ausschaltung von *Pax7* somit nur in den - durch apikal-basale Zellteilung - entstandenen *Myf5*-positiven Satellitenzellen von Bedeutung sein, da während der embryonalen Myogenese die Spezifizierung der Muskelvorläuferzellen zwar durch *Myf5* und *Mrf4* gesteuert wird, aber von *Pax7* unabhängig ist (Mansouri *et al.* 1996b). Ebenso sollte keine kontinuierliche Abnahme des Satellitenzellpools - wie in der konstitutiven *Pax7^{LacZ}* Nullmutation - zu beobachten sein, da die verbleibende Subpopulation an stammzellähnlichen Satellitenzellen immer *Myf5*-negativ bleibt und somit keine Ablation von *Pax7* erfolgt. Wie bei der *MyoD^{CreERT}/Pax7cKO* Mauslinie kann nur vermutet werden, ob der Verlust der *Pax7* Expression Auswirkungen auf die proliferierenden (*Myf5*-positiven) Satellitenzellen hat, oder ob auch hier der Zeitraum zwischen Aktivierung der Cre-Rekombinase und Determinierung der Vorläuferzellen zu gering ist, um eine Auswirkung auf die Regenerationsprozesse zu haben. Zum Zeitpunkt der Beendigung dieser Arbeit konnten bereits die ersten homozygoten *Pax7cKO* und *Myf5^{Cre}*-positiven Mäuse erhalten werden. Diese Tiere sind lebensfähig und zeigen keine morphologischen Auffälligkeiten. Jedoch konnte bereits bei den ersten homozygoten Doppelmutanten ein Wachstumsdefizit von ca. 33% festgestellt werden. Dieser - gegenüber der konstitutiven Nullmutation - abgeschwächte Phänotyp, könnte durch das ausschließliche Fehlen von *Pax7* in den mesodermalen Zelllinien hervorgerufen werden und führt nur zu einer Verzögerung des postnatalen Wachstums und nicht zum Tod der homozygoten Tiere. Zudem scheint diese Beobachtung im Kontrast zu den Vermutungen von Kuang und Mitarbeitern zu stehen, da nach dieser Theorie kein Phänotyp zu erwarten ist. Jedoch muss erst die Anzahl der Tiere erhöht und eine genauere Untersuchung der Mäuse durchgeführt werden (Immunhistochemie der Muskeln, Verteilung und Anzahl der Satellitenzellen zu verschiedenen Zeitpunkten, Primärkulturen der Satellitenzellen mit anschließenden Proliferationstests und Antikörperfärbungen, etc.), ehe eine endgültige Beurteilung erfolgen kann.

Im Zusammenhang mit den beobachteten asymmetrischen Zellteilungen der Satellitenzellpopulation, wurde von Kuang und Mitarbeitern auch eine Involvierung des Notch Signalweges diskutiert, da in den Untersuchungen eine Steigerung der Expression von *Notch-3* in den Myf5-negativen Zellen sowie eine erhöhte Aktivität des Notch-Liganden Delta-1 in den aktivierten Myf5-positiven Satellitenzellen dokumentiert werden konnte (Kuang *et al.* 2006). Die Bedeutung von Notch und seinem negativen Regulator Numb für die asymmetrische Zellteilung im Bezug auf verschiedene Entwicklungsprozesse ist bereits seit einiger Zeit bekannt (Horvitz und Herskowitz 1992; Rhyu *et al.* 1994) und konnte auch schon für die Satellitenzellen nachgewiesen werden (Conboy *et al.* 2005; Shinin *et al.* 2006). Von Kuang und Mitarbeitern wurde deshalb eine Inhibition des Notch Signalwegs im Zellkultursystem durchgeführt, die nachweislich eine Verringerung der Pax7-positiven und Myf5-negativen Subpopulation zur Folge hatte. Durch die in dieser Arbeit generierten *Pax7cKO* Linie sowie des bereits erwähnten und demnächst zur Verfügung stehenden *Pax7^{MCM}* Mausstamms, kann jedoch eine Überprüfung der Ergebnisse und Vermutungen direkt im biologischen System erfolgen. So könnte beispielsweise durch Verkreuzung der *Pax7^{MCM}* und konditionellen *Delta-1 Knock Out* Mäusen (*Dll1^{tm1Mjo}*; Hozumi *et al.* 2004) ein Modell generiert werden, in dem eine Inaktivierung des Notch Signalwegs durch temporäre Tamoxifen Applikation ausschließlich in den adulten Satellitenzellen erfolgt. Dieser Versuchsansatz ist notwendig, da eine frühere Inaktivierung von Delta-1 zur Blockade der terminalen Differenzierung der Myoblasten während der embryonalen Myogenese und zum frühzeitigen Tod der Tiere auf Grund von Blutungen in das Neuralrohr bei E10.5 führt (Hrabě de Angelis *et al.* 1997; Delfini *et al.* 2000). Alternativ könnte auch der konditionelle *Knock Out (Rbpj^{tm1Hon}*; Han *et al.* 2002) des durch Notch aktivierten Transkriptionsfaktors CBF-1 (RBP-Jk) verwendet werden, der eine Blockade des kanonischen Notch Signalwegs zur Folge hätte. Ein *vice versa* Ansatz wäre die Erstellung eines weiteren Mausmodells durch die Verkreuzung der *Pax7^{MCM}* und *ROSA^{Notch}* Mäuse (Murtaugh *et al.* 2003). Hier würde durch die Pax7-abhängige Induktion der Cre-Rekombinase eine Überexpression der intrazellulären Domäne von *Notch-1* (NICD) erfolgen, die auch eine Aktivierung des Notch-3 Signalweges zur Folge hätte, da die Spezifität der einzelnen Notch Signalwege durch die Interaktion von Ligand und Rezeptor bestimmt wird und weniger durch die Abspaltung der NICD. Korreliert nach der Hypothese von Kuang und Mitarbeitern tatsächlich die *Notch-3* Expression mit dem „Stammzell-Status“ der Satellitenzellen, sollten an den Myotuben hauptsächlich Myf5-negative Stammzellen beobachtet werden und die Regenerationsfähigkeit der Mäuse eingeschränkt sein, da diese Zellen im geringeren Maße an der Proliferation und Differenzierung zu Myotuben teilhaben (Kuang *et al.* 2006). Kombiniert mit einem Allel der *Pax7cKO* Linie könnte bei einer Bestätigung dieser Vermutungen gleichzeitig die Bedeutung der Pax7 Expression für das Überleben bzw. für die Aufrechterhaltung dieser Subpopulationen überprüft werden. Da nur wenige Moleküle NICD ausreichen, um die Notch Signalkaskade zu aktivieren, stellt die Überexpression von NICD im *ROSA* Locus eine relativ unphysiologische Situation dar, weshalb die Inaktivierung von NICD Inhibitoren, wie z.B. SPEN/MINT wahrscheinlich einen spezifischeren Phänotyp auslöst (Oswald *et al.* 2002, 2005). Mit

Hilfe von konstitutiven *Knock Out* Konstrukten für diese Inhibitoren konnte bereits ein übereinstimmender Phänotyp mit dem konstitutiven Notch *Knock Out* dokumentiert werden (Kuroda *et al.* 2003). In der Arbeitsgruppe um Tasuku Honjo wurde kürzlich ein konditioneller Knock Out von MINT generiert (*Spen^{tm2.2Hon}*; Yabe *et al.* 2007), welcher wie die *ROSA^{Notch}* Mäuse, zusammen mit der *Pax7^{MCM}* Linie eine fortwährende Aktivierung des kanonalen Notch Signalwegs in den Myf5-negativen Satellitenzellen erlaubt.

Die Generierung der *Pax7cKO* Mauslinie stellt ein überaus hilfreiches Werkzeug dar, um verschiedene aktuelle Fragestellungen zu Pax7 im Zusammenhang mit der embryonalen und postnatalen Myogenese sowie der adulten Regenerationsprozesse zu untersuchen. Dabei zeichnen sich zwei Schwerpunkte ab: Zum einen die genaue Identifikation der Prozesse, die zum frühzeitigen Tod eines Großteils der Mutanten führen, des Weiteren die Analyse der Bedeutung von Pax7 während der postnatalen Entwicklung und Regeneration im Zusammenhang mit den MRFs, welche bislang durch diesen frühen lethalen Phänotyp erschwert wurde. Darüber hinaus bleibt auch zu klären, ob sich die, mit Hilfe des konstitutiven *Knock In*, bislang gewonnenen Erkenntnisse über die Bedeutung von Pax7 während der adulten Regeneration im Bezug auf die möglicherweise exklusive Rolle der wenigen überlebenden Tiere faktisch bestätigen lassen. Möglicherweise kann auch die Frage beantwortet werden, ob die Satellitenzellen eine separate myogene Linie darstellen, die während der Emryogenese angelegt wird, um als Reservoir für späte Aufgaben zu dienen, oder sich diese von embryonalen oder fötalen Myoblasten ableiten, die durch eine temporäre Blockade der Differenzierung ihre Funktion als Vorläuferzellen während der embryonalen Myogenese erhalten.

6.2. Die Inaktivierung von Pax7 durch das „hypomorphe“ $Pax7^{LoxP/Neo}$ Allel erfolgt durch fehlerhafte Prozessierung der prä-mRNA und führt zu einer leicht veränderten Kopie des Phänotyps der Nullmutation.

Im Verlauf der Generierung der *Pax7cKO* bzw. *Pax7KO* Mauslinie wurden durch Verpaarungen der chimären Gründertiere untereinander bzw. mit deren Transmittern auch Mäuse mit homozygoten $Pax7^{LoxP/Neo}$ Allel erhalten. Alle diese Tiere zeichneten sich, trotz der Tatsache, dass in diesen Mäusen noch keine Deletion von Teilen des *Pax7* Locus stattgefunden hatte, durch postnatale Entwicklungsstörungen aus, die dem Phänotyp der $Pax7^{lacZ}$ Nullmutation glich und spätestens nach sieben Wochen zum Tod der Tiere führte (Mansouri et al. 1996b; Seale et al. 2000). Bei näherer Betrachtung des Phänotyps, konnten jedoch - wenn auch nur geringe - Unterschiede zwischen den einzelnen Mauslinien festgestellt werden. So zeigen die heterozygoten $Pax7cKO^{Neo}$ Mäuse im Gegensatz zur *Pax7KO* Linie, während der gesamten postnatalen Entwicklung, keinen Unterschied zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren. Dagegen ist das Wachstumsdefizit der homozygoten $Pax7cKO^{Neo}$ Tiere mit einem Alter von 40 Tagen gegenüber der Nullmutation wesentlich stärker ausgeprägt. Eine Übereinstimmung zwischen den Mausstämmen stellt jedoch der vermeintliche Grund der postnatalen Wachstumsstörungen dar, denn beide Linien zeichnen sich 40 Tage nach der Geburt durch einen fast vollständigen Verlust der Satellitenzellen aus. Da, wie bereits erwähnt, kein spezifischer Pax7 Antikörper für eine Westernblot-Analyse zur Verfügung stand, wurde mittels einer RT-PCR, die Prozessierung der prä-mRNA überprüft. Dabei zeigte sich ein weiterer Unterschied zur *Pax7KO* Linie, und darüber hinaus auch ein möglicher Grund für den beobachteten Phänotyp der $Pax7cKO^{Neo}$ Mäuse. Aus den Untersuchungen anderer *Knock Out* Modelle zeigte sich, dass die Insertion der Neomycin-Selektionskassette zu Veränderungen in benachbarten Genen führt und durch diesen Effekt ein Phänotyp entsteht (Braun et al. 1992; Kaul et al. 2000). Im vorliegenden Fall zeigte sich jedoch, dass die *Pax7* Expression im Bereich der Exone zwischen den eingeführten loxP Erkennungsstellen bereits ohne Deletion völlig unterdrückt wird, während in den Exonabschnitten, die 3' der Neomycinkassette liegen, eine mit dem Wildtyp vergleichbare Menge an PCR Produkt nachgewiesen werden konnte. Vermutlich wird in diesem Bereich, aufgrund des in der Neomycin-Kassette enthaltenen starken PGK-Promoters, eine trunkierte Form der *Pax7* cDNA gebildet. Ob dieses Spleißprodukt jedoch noch in der Lage ist, Ausgangspunkt für ein stabiles oder sogar eingeschränkt funktionsfähiges Translationsprodukt zu sein, kann nur mit einem spezifisch funktionierenden Pax7 Antikörper eindeutig geklärt werden. Tatsache ist jedoch, dass sich in den verbleibenden Exonen IV bis VIII sowohl eine Oktapeptid Region als auch die Homeodomäne befinden (Mansouri et al. 1994). Letztere ist als DNA-Bindedomäne, wie die deletierte *Paired* Domäne, für die Regulation wichtiger Entwicklungsprozesse zuständig, während das Oktapeptid Motiv für die Interaktion mit den Korepressoren der Groucho (Gro/TLE) Familie und somit für eine korrekte Musterung des Neuralrohrs verantwortlich ist (Muhr et al. 2001; Chi und Epstein 2002). Eine weitere Funktion, die von der

Oktapeptidregion ausgeht, ist die Methylierung des Pax7 Proteins (Gruss und Walther 1992; Ziman und Kay 1998). Neben den bereits geschilderten Unterschieden, scheint auch die Lebenserwartung der homozygoten Mutanten zwischen den beiden Linien zu variieren, da die meisten *Pax7KO* Tiere bereits nach 3 Wochen sterben, während die Vertreter der *Pax7cKO^{Neo}* Mauslinie häufig ein Alter zwischen 5 und 7 Wochen erreichen. Da die Satellitenzellen in der *Pax7cKO^{Neo}* Linie bereits am Tag 40 fast komplett verschwunden waren, weist dieses Resultat daraufhin, dass der Satellitenzell-Phänotyp nicht die primäre Todesursache darstellt. Die Anzahl der homozygoten Tiere beider Linien ist jedoch noch zu gering um genaue statistische Aussagen zu treffen.

Momentan lässt sich nur schwer abschätzen, welche Bedeutung der Beobachtung dieses „hypomorphen“ *Pax7* Allels für die Aufklärung der bereits diskutierten Fragestellungen, im Bezug auf die Funktion von Pax7, zukommen wird. Möglicherweise kann durch die Rückkreuzung dieser Linie in einen SV129 Hintergrund die Lebenserwartung der homozygoten Tiere weiter gesteigert werden. Außerdem wäre es denkbar, dass durch eine intensivere Analyse der Anzahl und Verteilung der Satellitenzellen an verschiedenen Zeitpunkten, neue Erkenntnisse über die Dynamik des Verlustes gewonnen werden können. Interessant wäre auch die in der *Pax7cKO^{Neo}* auftretenden Proteine zu isolieren und diese mit den natürlich vorkommenden Splice-Formen zu vergleichen. Hierdurch wären gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Rolle dieser Splice-Formen in der Wildtypsituation möglich. Da in Folge des letztlich letalen Phänotyps, für die *Pax7cKO^{Neo}* Linie die gleichen Probleme wie für den konstitutiven *LacZ Knock In* bestehen, wird der Schwerpunkt der weiterführenden Arbeiten jedoch hauptsächlich in der Verwendung der konditionellen *Knock Out* Linie *Pax7cKO* liegen.

6.3. mVITO-1 und mVITO-2 sind Mitglieder einer neuen Genfamilie, welche durch die Scalloped Interaktionsdomäne mit Vertretern der TEF-Familie interagieren können

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Braun konnte ein humanes cDNA Fragment isoliert werden, dass exklusiv im Muskelgewebe exprimiert wird. Nach dem Vergleich der Aminosäuresequenz des Klons mit den Sequenzen bereits bekannter Proteine konnte eine Homologie zu dem humanen TONDU und dem Vestigial aus *Drosophila melanogaster* gefunden werden, weshalb der Name VITO-1 (für Vestigial und TONDU verwandt) gewählt wurde. Die größte Ähnlichkeit wurde dabei in einem Motiv gefunden, das als SID (Scalloped interaction domain) beschrieben ist (Vaudin *et al.* 1999; Mielcarek *et al.* 2002).

Durch weitere Sequenzvergleiche konnten zwei unterschiedliche Maus EST-Klone mit eindeutigen Homologien lokalisiert werden. Ein Klon wurde, mit einer Identität über die gesamte cDNA von fast 70% auf DNA- und über 80% auf Aminosäureebene, als das homologe *VITO-1* Gen der Maus identifiziert und als *mVITO-1* bezeichnet. Der zweite EST-Klon zeigte ausschließlich im Bereich der SID eindeutige Ähnlichkeiten mit den Sequenzen von *mVITO-1* und *hVITO-1*; sowohl auf DNA-

(92,6 %) und Aminosäureebene (100%). Für diesen cDNA-Klon konnte ebenfalls ein humanes Homolog nachgewiesen werden, das als *hVITO-2* bezeichnet wurde. Die große Ähnlichkeit in der DNA- und Aminosäuresequenz der jeweiligen Kandidaten von Maus und Mensch (siehe Abbildung 20) zeigt eindeutig, dass es sich bei den identifizierten Klonen tatsächlich um die homologen Vertreter eines Gens handelt. Die Beschränkung eines hohen Konservierungsgrades auf das Scalloped Interaktions-Motiv zeigt ferner, dass die evolutionäre Trennung von VITO-1 und VITO-2 noch vor der Aufteilung der Spezies erfolgt sein muss (siehe Abbildung 21). Dies würde darauf hinweisen, dass die VITO Gene zu einer phylogenetisch alten Gruppe gehören. Die dennoch sehr hohe evolutionäre Konservierung in der SID weist in diesem Kontext eindeutig auf die hohe Bedeutung der Domäne für die Funktion der VITO Proteine hin. Die Vermutung, dass die Entstehung der beiden Gene vor der Speziestrennung erfolgt sein muss, wird zusätzlich von der Beobachtung gestützt, dass die Aufteilung in *hVITO-1* und *mVITO-1* bzw. *hVITO-2* und *mVITO-2* im gleichen phylogenetischen Zeitrahmen geschehen sein muss, da für die Vertreter der beiden Gene nahezu die gleichen Sequenzunterschiede feststellbar sind und somit die Länge der Äste im Dendrogramm annähernd gleich ist (Abbildung 21A und B).

Es gibt keine einheitliche Definition für Genfamilien, auch keine konsistenten Angaben, ab welcher Sequenzähnlichkeit ein Gen einer Genfamilie zugeordnet werden kann. Auch die Größe von Genfamilien variiert stark. So gehören z. B. die Oberflächen-Glykoproteine aus Trypanosomen zu einer Multigenfamilie mit mehr als 1000 Mitgliedern und sind damit verantwortlich für die antigenische Variabilität dieser humanpathogenen Organismen (Song *et al.* 1997). Grundsätzlich könnte man eine Genfamilie jedoch als zwei oder mehrere Genorte mit ähnlichen Nukleotidsequenzen, die von einer gemeinsamen Stammsequenz abgeleitet sind, definieren. Danach lässt sich aus den Ergebnissen der Homologieuntersuchung und dem daraus hergeleiteten phylogenetischen Baum eindeutig ein gemeinsamer Ursprung herleiten und der Schluss ziehen, dass es sich bei den beiden Sequenzen tatsächlich um Mitglieder einer Gen-Familie handelt.

Aufgrund der hohen Konservierung innerhalb der Scalloped Interaktionsdomäne zwischen VITO-1 und VITO-2 erfolgte ein weiterer Sequenzvergleich mit den NCBI Datenbanken, um weitere exprimierte Sequenzen mit einer Homologie zur SID zu finden. Dazu wurde nur die Aminosäuresequenz der SID von *mVITO-1* verwendet und mit dem *blastx* Programm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) nach Übereinstimmungen in den translatierten Leserastern der EST-Klone gesucht (Tabelle 7). Unter den identifizierten Sequenzen befand sich eine bereits annotierte cDNA, die als *vestigial related* angeführt wird. Als Referenz wird ein nicht-veröffentlichtes Papier von 2000 zitiert, das durch den Titel „*Isolation of a cDNA encoding mouse vestigial-related factor that interacts with the TEAD family transcription factors*“ den Schluss zulässt, dass ähnlich zu dieser Arbeit durch Sequenzähnlichkeiten zum *Vestigial* Gen auf eine mögliche Funktion als Cofaktoren der TEFs geschlossen wurde (Yasunami 2000). Für diese cDNA Sequenz sowie einigen weiteren Kandidaten aus der Tabelle 7 wurden entsprechende EST-Klone über das RZPD und die *RIKEN Fantom Bank* bezogen. Zunächst wurde damit begonnen,

die Expressionsmuster der einzelnen Kandidaten zu überprüfen, um festzustellen ob es sich tatsächlich um exprimierte Sequenzen handelt und gegebenenfalls erste Hinweise auf die Funktion der codierten Proteine als Cofaktoren der TEFs in den entsprechenden Geweben zu finden. Besonders interessant wäre es dabei, einen Kandidaten zu identifizieren, der eine spezifisch im Herzen lokalisierte Expression zeigt. Vermutlich wäre ein solcher Kandidat einer der potentiellen Cofaktoren für die herz-spezifische Aktivität des TEF-1, dessen Notwendigkeit für die korrekte myokardiale Entwicklung und Differenzierung bereits gezeigt werden konnte (Melin *et al.* 1993; Chen *et al.* 1994). Tatsächlich konnte in einer ersten *in-situ* Hybridisierung eine putative Lokalisation von *vestigial related* ausschließlich in den Herzanlagen von Mäuseembryonen gefunden werden. Diese Beobachtungen müssen jedoch noch durch weitere experimentelle Untersuchungen verifiziert werden. Sollte sich jedoch die herz-spezifische Expression bestätigen, wäre das *vestigial related* Gen ein interessantes neues Mitglied der VITO-Familie und würde die Bedeutung dieser Genfamilie, über eine Beteiligung bei der muskelspezifischen Entwicklung hinaus, erweitern.

Tabelle 7. Die Suche nach weiteren Maus EST-Klonen mit einer Homologie zur Scalloped Interaktions-domäne, die in den beiden Vertretern der VITO Gen-Familie hoch konserviert ist. Mit Hilfe des blastx Programms und der mVITO-1 SID als Referenz, konnten verschiedene EST-Klone identifiziert werden (grau hinterlegt). Bereits annotierte Gene der Maus sowie das Drosophila Vestigial (Drosp-Vg) als zusätzlicher Vergleich, wurden weiß hinterlegt. Übereinstimmende Aminosäuren wurden grün markiert und nah verwandte Aminosäuren (PAM250 Wert > 0) gelb gekennzeichnet sowie die Höhe der Konservierung berechnet (Konsensus). Das Raster gibt das Leseraster der cDNA an, in welchen die Homologie zur SID gefunden wurde.

Name	Raster	SID Domäne	Konsensus	Andere Klone
mVITO-1		NSRCVLFTYFQGDISS-V-VDEHFSRALS	100,0%	
mVITO-2		NSRCVLFTYFQGDIGS-V-VDEHFSRALG	92,6%	
Vestigial related		NAGSVIIFTYFEGDINS-M-VDEHFSRALR	75,0%	AA475599 AB036708
Drosp-Vg		SASCVVFTNYSGDTAS-Q-VDEHFSRALN	61,1%	
BU917950	+1	LLSSGVPNLXQGDIGS-V-VDEHFSRALG	58,3%	
XM195012	+1	CYHPAPQPGQQGDIGS-V-VDEHFSRALG	58,3%	
AC074042	+1	TPRCLIVSFFQDELAL-V-VQCHVVVKYFN	38,0%	
BB519485	+1	FSKTFLFYTFPN-SNISPTFHPLTPTALC	33,3%	
BE573657	+2	NSRCVLEHRASRDWTFHVLFPRPRLFLPAQ	31,5%	
BY709817	+3	NSRCVLEHRASRDWTXHVLFPRKFLFLPAQ	30,6%	
AC074042	+2	VSRCVWSTYSPGV-TLAKNLAIAILNLLI	30,6%	
BE284599	-1	NSRCVLEHRASRDWTFHVLFPRPRLFLPAQ	30,6%	
AA638146	+1	AFRCGL--QFLGNVASRNEROSIVVWHA	27,8%	
AC074042	+3	ISREVRFTYLT-LYTKRNPEQVTQDKL-K	23,2%	
AV221203	+2	-YIILPFIKWDILE-I-SENMFRLFLS	23,2%	
BG176252	+3	NSLCVLFGS-SSQCTTWTFGYQDPYVTKQ	23,2%	
CF748488	+1	VFHCLKYL-IRFNSVS-I-VALRIKQTAA	22,2%	
BB290982	+3	VITCVLFTWLFMHCRRGSLTSFSTRNCTA	21,3%	
BF583094	+1	VKHRDAFTYQFLANHPSSPFAVEFTCLN	21,3%	
CF748488	+2	QLRNLGLC-AFOGN-TTANHQEOPFIVLIS	20,4%	
BF149586	+1	ARLTTTRKTPQCPPEI-Y-SDTQFPSLOS	20,4%	
BF118140	+2	YNTFPL-TYFPHNIQYLTPKAILNTFKPI	20,4%	

Die, beim Vergleich der Basen- und Aminosäuresequenz der *mVITO-1* cDNA identifizierte SID, ist - wie bereits vermutet - für eine Interaktion mit den TEF Faktoren notwendig, was durch Co-Immunopräzipitationen eindeutig dokumentiert werden konnte. Zusammen mit diesem Nachweis, konnte gleichzeitig die Notwendigkeit der SID für die Interaktion der Proteine gezeigt werden, da bei den hergestellten VITO-Fusionsproteinen ohne die SID kein TEF copräzipitiert werden konnte. Es wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass eine Verkürzung des C-terminalen Bereichs der VITO Proteine keinen Einfluss auf die Interaktion von TEFs und VITOs hat.

Eindeutig lies sich für die beiden VITO Proteine eine Komplexbildung mit TEF-1 nachweisen (Abbildung 23 und Abbildung 25), die beim Vergleich der beiden Präzipitationen im Falle des *mVITO-1* zunächst stärker erscheint als die *mVITO-2*/TEF-1 Interaktion. Jedoch wurden die beiden Experimente nicht gleichzeitig durchgeführt und bereits bei der Menge der eingesetzten *in vitro* translatierten Proteine konnten Unterschiede festgestellt werden, weshalb die Stärke der Co-Immunopräzipitationen unterschiedlich ausfallen kann. Eine unterschiedliche Affinität von VITO-1 und VITO-2 zu TEF-1 würde auch den Ergebnissen der Sequenzanalyse der beiden Gene widersprechen, da eine Homologie innerhalb der SID mit 93% gegen eine unterschiedliche Funktionsweise spricht. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Bereiche außerhalb des SID Motivs für die Funktionsweise der Domäne und somit der Selektivität gegenüber den potentiellen Bindungspartnern verantwortlich sind. Von Simmonds und Mitarbeitern sowie von Vaudin *et al.* wurden bereits Untersuchungen zu den Bindeeigenschaften der SID in Vestigial durch Verwendung verschiedener Deletionskonstrukte durchgeführt (Simmonds *et al.* 1998; Vaudin *et al.* 1999). Jedoch beschränkten sich die Untersuchungen auf Deletionen innerhalb der Domäne, bzw. wurde in den Analysen hauptsächlich auf die Fragestellung geachtet, ob eine Interaktion stattfindet oder nicht. Jedoch können auch in den veröffentlichten Western Blots deutliche Unterschiede in der Stärke der Interaktion zwischen TEF-1 und den verschiedenen Vestigial Konstrukten festgestellt werden (Simmonds *et al.* 1998), was eine Abhängigkeit der Proteinwechselwirkung von den umgebenden Sequenzen beweist. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass dabei der C-terminale Teil der VITO Proteine vermutlich keine Rolle spielt, da die Co-Immunopräzipitationen mit diesen verkürzten Konstrukten keinen Unterschied zu den Fusionsproteinen mit vollständiger cDNA zeigten. Zur genauen Überprüfung der beobachteten Unterschiede zwischen *mVITO-1* und *mVITO-2* wurde nachträglich eine weitere parallele Präzipitation mit TEF-1 durchgeführt, die zwar nur sehr geringe Unterschiede zwischen beiden VITO Proteinen zeigte, jedoch die vorherigen Beobachtungen nicht völlig widerlegte. Es ist also nicht auszuschließen, dass den beiden Vertretern der VITO Genfamilie durch eine unterschiedliche Selektivität gegenüber TEF-1 auch eine alternative Funktion als Cofaktor zukommt. Um diese These zu verifizieren müssten weitere VITO-Fusionsproteine mit unterschiedlichen Deletionen erzeugt und auf ihre Bindungseigenschaften mit TEF-1 untersucht werden. Ferner wäre auch eine Substitution der SID zwischen *mVITO-1* und *mVITO-2* nötig, um die beobachteten Unterschiede in der Intensität der Komplexbildung zu bestätigen und den Einfluss der umgebenden Sequenzen genauer zu bestimmen.

Neben der Co-Immunopräzipitation mit TEF-1 wurde versucht, eine Interaktion zwischen den VITO Proteinen und TEF-3 nachzuweisen. Trotz mehrfacher Wiederholungen des Versuchs und der Verwendung verschiedener Protokolle und Reaktionsbedingungen konnte jedoch keine physikalische Interaktion zwischen den Proteinen festgestellt werden. Zwar kann in der Co-Immunopräzipitation mit dem C-terminal verkürzten mVITO-2 eine zweite Bande beobachtet werden, die auch der Größe des TEF-3 entspricht (Abbildung 26, Bahn 15), jedoch kann diese Bande auch schon bei der alleinigen Präzipitation des mVITO-2 Proteins beobachtet werden. Vermutlich stammt diese Bande von Komponenten des Retikulozytenlysats oder stellt ein sekundäres Produkt der *in vitro* Translation dar. Nachfolgende Untersuchungen mit TEF-3 konnten jedoch einen indirekten Nachweis der Proteinwechselwirkung mit den VITO Proteinen aufzeigen. Neben der Beobachtung, dass die Co-Transfektion von mVITO-2 und TEF-3 eine Transaktivierung MCAT-abhängiger Reporter bewirkt (siehe 5.5.2. und 6.4.), konnte von anderen Mitarbeitern der AG Braun in verschiedenen Zelllinien eine Translokation überexprimierter VITO Konstrukte mit TEF-1 bzw. TEF-3 in den Zellkern beobachtet werden. In der 293T Fibroblastenzelllinie lässt sich diese Translokation sogar nur exklusiv für mVITO-1 und TEF-3 nachweisen (Mielcarek *et al.* unveröffentlicht). Auch Maeda und Mitarbeiter zeigen in ihrer Arbeit mit Hilfe eines *mammalian two-hybrid* Assays eine direkte Interaktion zwischen TEF-1 und mVITO-1, bzw. Vgl-2 nach der Nomenklatur von Stewart *et al.* (siehe Tabelle 3). Ferner konnte eine indirekte Beeinflussung der DNA-Bindeeigenschaften von TEF-3 durch mVITO-1 (Vgl-2) beobachtet werden, was von den Autoren auf eine direkte Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen zurückgeführt wird (Chen *et al.* 2004). In einer weiteren Publikation dieser Arbeitsgruppe werden darüber hinaus die Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe bestätigt, dass während der Muskeldifferenzierung ein Anstieg der mVITO-1 (Vgl-2) Expression zu verzeichnen ist und mit einer gleichzeitigen vermehrten Bildung von TEF-3 einhergeht (Yockey *et al.* 1996; Meada *et al.* 2002).

Ein möglicher Grund für die Tatsache, dass eine VITO/TEF-3 Komplexbildung durch eine Co-Immunopräzipitation nicht direkt nachgewiesen werden konnte, ist die Verwendung *in vitro* translaterter Proteine. Die Herstellung der Proteine durch das Retikulozytenlysate gewährleistet zwar eine stabile Translation der Expressionskonstrukte, alle weiteren postranslationalen Prozesse, die sich normalerweise *in vivo* ereignen, können jedoch nicht stattfinden und sich so möglicherweise negativ auf die Bindeeigenschaften zu den TEFs auswirken. Diese Tatsache könnte auch ein Grund dafür sein, warum Unterschiede zwischen den VITO Proteinen im Bindungsverhalten zu TEF-1 beobachtet werden konnten. Aus diesem Grund wurde eine weitere Co-Immunopräzipitation mit überexprimierten Proteinen *in vivo* durchgeführt. Da bis vor kurzem keine kommerziellen Antikörper für TEF-3 erhältlich waren, konnte diese „*In vivo* Co-Immunopräzipitation“ jedoch nur für einen weiteren Nachweis der Interaktion mit TEF-1 genutzt werden. Nach Präzipitation der Zellysate mit dem TEF-1 Antikörper und anschließender Detektion der VITO Proteine durch das fusionierte Myc-Antigen, konnte eine deutlich erhöhte Menge an mVITO-1 bzw. mVITO-2 in den Ansätzen mit Co-Transfektion der Expressionskonstrukte beider untersuchten Proteine festgestellt werden. Da in den entsprechenden

Kontrollansätzen keine oder nur eine geringe Präzipitation der VITO Proteine zu verzeichnen war, kann diese Erhöhung nur durch eine gemeinsame Fällung mit TEF-1 erfolgt sein und stellt einen eindeutigen Beweis für die TEF-1/VITO Komplexbildung dar (Abbildung 27). Es lassen sich jedoch auch hier Unterschiede in der Intensität der Wechselwirkung feststellen. Vergleicht man die Stärke der Western Blot Signale zwischen den Ausgangslysaten und den Präzipitaten, kann für mVITO-1 eine verhältnismäßig größere Menge an Protein detektiert werden (Abbildung 27, A9-A12), während das Verhältnis zwischen präzipitierten und dem im Lysat bereits vorhandenen mVITO-2 nahezu gleich ist (Abbildung 27, B9-B12). Dies bestätigt die Beobachtungen aus den vorangegangenen Co-Immunopräzipitationen mit den *in vitro* translatierten VITO Proteinen, welche ebenfalls Unterschiede im Bindungsverhalten zu TEF-1 aufzeigten. Da die „*In vivo* Co-Immunopräzipitationen“ *vice versa* durchgeführt wurden, kann aus den Ergebnissen noch eine weitere Schlussfolgerung gezogen werden, denn der Nachweis von TEF-1 nach umgekehrter Präzipitation der VITO Proteine aus den Zellysaten durch den Myc Antikörper zeigt keine spezifischen Signale. Daraus kann entweder geschlossen werden, dass keine Interaktion erfolgt - was den vorangegangenen Ergebnissen jedoch völlig widersprechen würde; oder, dass die Komplexbildung der beiden Proteine in nicht-äquimolaren Verhältnissen erfolgt. Dies würde bedeuten, dass ein TEF-1 Protein mit mehreren VITO Proteinen gleichzeitig interagieren kann, und somit zur Präzipitation von TEF-1 mehrere VITO Fusionsproteine notwendig sind. Daher könnte die Menge an gebildeten VITO Proteinen nicht ausreichen, um eine genügend große Anzahl an TEF-1 zu präzipitieren und immunhistochemisch nachzuweisen.

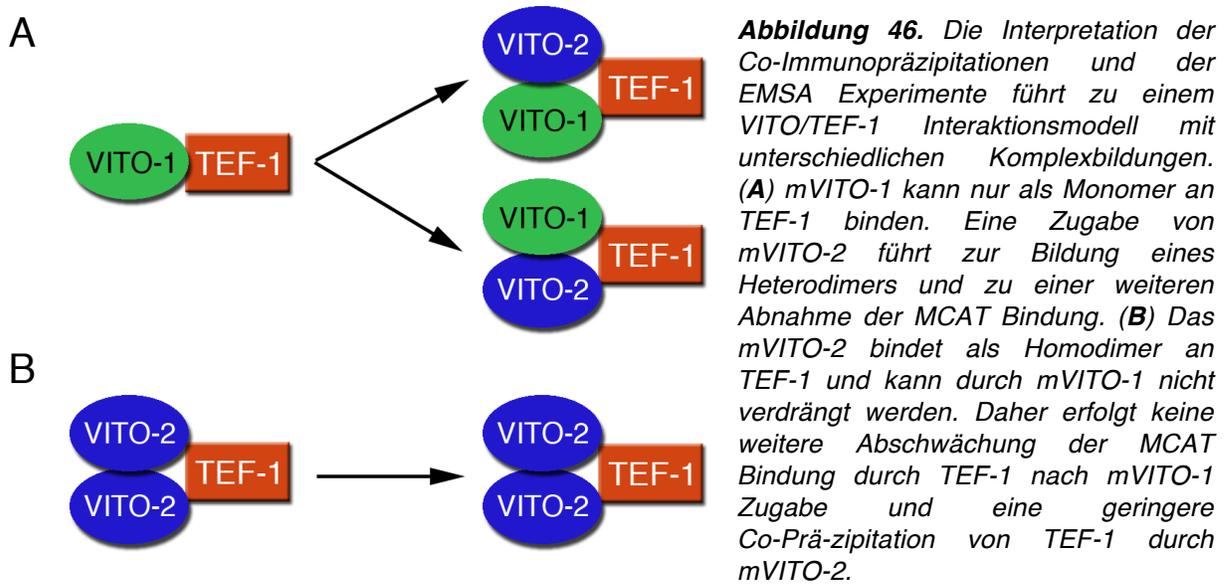
Mit Hilfe zweier verschiedener Ansätze konnte in der vorliegenden Arbeit die vorhergesagte Wechselwirkung zwischen dem Transkriptionsfaktor TEF-1 und den beiden VITO Proteinen nachgewiesen werden, was einen ersten Beweis der postulierten Funktion der VITO Genfamilie als Cofaktoren der TEF-spezifischen Genregulation darstellt. Zwar konnte in dieser Arbeit noch kein direkter experimenteller Nachweis für eine Interaktion zwischen TEF-3 und den Vertretern der VITO Genfamilie erfolgen, jedoch ist, auf Grund der hohen Homologien zwischen den VITO Proteinen - besonders innerhalb der SID - die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass auch hier eine Wechselwirkung stattfindet. Vermutlich sind für diesen Nachweis andere Reaktionsbedingungen notwendig, weshalb die Anwendung weiterer *Pulldown* Assays oder eine Co-Immunpräzipitation mit einem TEF-3 Antikörper und zellulär exprimierter Proteine zu den erwarteten Ergebnissen führen könnte. Alternativ wäre auch eine weitere „*in vivo*“ Co-Immunopräzipitation denkbar, in der eine Interaktion indirekt - durch Konkurrenz zwischen TEF-1 und TEF-3 um die Bindung zu VITO-1/2 - nachgewiesen werden könnte. Ebenfalls ungeklärt bleibt die Frage, ob die hier nicht-untersuchten Vertreter der TEF Familie, TEF-4 und TEF-5, ebenfalls zur Bindung der VITO Proteine befähigt sind, oder ob eine Interaktion auf TEF-1 und möglicherweise TEF-3 beschränkt ist und damit eine selektive Steuerung der TEF-spezifischen Genregulation ermöglicht wird.

6.4. Die Interaktion zwischen den TEF und VITO Proteinen verändert die DNA-Bindeeigenschaften der Transkriptionsfaktoren und führt zu einer Transaktivierung MCAT-abhängiger Reporter

Ausgehend von der Beobachtung, dass die VITO Proteine nachweislich mit TEF-1 und vermutlich mit TEF-3 interagieren können, stellte sich die Frage nach der biologischen Funktion dieser Wechselwirkung. Von den TEF Faktoren ist bekannt, dass sie als Transkriptionsfaktoren eine DNA-Bindedomäne besitzen, die sie zur Interaktion mit unterschiedlichen DNA Motiven befähigt (Davidson *et al.* 1988; Xiau *et al.* 1987; Hwang *et al.* 1993). Eines dieser Bindungsmotive gehört zur Gruppe der MCAT Sequenzen, die in den Promotoren verschiedener herz- und muskelspezifischer Gene in verschiedener Kopienzahl vorhanden sind (Cooper und Ordahl 1984, 1985; Mar und Ordahl 1988). Da die Expression der TEFs - insbesondere von TEF-1 - jedoch nicht ausschließlich auf diese Gewebe beschränkt ist, wurde schon länger die Existenz von Cofaktoren gefordert, welche die Aktivität der Transkriptionsfaktoren auf bestimmte Gewebe begrenzt (Guarente 1995; McKenna und O'Malley 2002). Anhand dieser Feststellungen konnte vermutet werden, dass die VITO Proteine möglicherweise eine Gruppe solcher Cofaktoren darstellt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es durch die VITO Proteine zu einer veränderten Wechselwirkung der TEFs mit der Transkriptionsmaschinerie kommen muss. Dies kann durch mehrere Möglichkeiten erfolgen. Zum einen könnte es sich bei den VITOs um sogenannte *Bridging* Faktoren handeln, die eine direkte Verbindung zwischen den TEFs und dem Transkriptionsapparat herstellen. Eine weitere Möglichkeit könnte die Veränderung der DNA-Bindeeigenschaften der TEA/ATTS Domäne durch interaktionsbedingte Konformationsänderungen sein. Diese Veränderung kann zur Abschwächung oder zur Verstärkung der Bindungsaffinität führen, was wiederum eine Veränderung der Transkription zur Folge hätte. Ebenso ist es vorstellbar, dass die VITO Proteine als negative Cofaktoren fungieren und eine Repression der TEF-abhängigen Genaktivierung bewirken.

Eine Möglichkeit diese Hypothesen zu verifizieren, war die Durchführung von *Bandshift* Experimenten, um mögliche Veränderungen der DNA-Bindungseigenschaften der TEA/ATTS Domäne zu überprüfen sowie Transaktivierungsversuche mit MCAT-abhängigen Reporterkonstrukten. Die in den *Bandshift* Experimenten erwartete gemeinsame Interaktion der MCAT Motive zusammen mit den VITO und den TEF Proteinen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dieser so genannte „*Supershift*“ sollte durch eine verlangsamte Bewegung des markierten MCAT Motivs durch Bindung beider Proteine entstehen. Mögliche Ursachen könnten beispielsweise die verwendeten Reaktionsbedingungen oder das Fehlen weiterer - für die Komplexbildung notwendiger - Cofaktoren sein. Trotz Verwendung verschiedener Reaktionspuffer und Konditionen sowie Reaktionstemperatur und Kompetitor-konzentration konnte im Rahmen dieser Arbeit kein *Supershift* beobachtet werden. Jedoch könnten noch als weitere Möglichkeiten Veränderungen des pH-Werts oder der im Puffer verwendeten Salzkonzentration in Betracht kommen. Ebenso wäre auch ein Zusatz von Zelllysaten, die das Fehlen weiterer potentieller Cofaktoren kompensieren, denkbar.

Trotz der Tatsache, dass keine direkte Interaktion der VITO Proteine mit den TEFs und den MCAT Motiven *in vitro* nachgewiesen werden konnte, lässt sich trotzdem eine indirekte Wechselwirkung beobachten. Im Vergleich der Menge der gebundenen radioaktiv markierten Oligos zwischen der Inkubation mit dem TEF/VITO Gemisch und den TEFs allein, sind deutliche Veränderungen erkennbar. Es werden deutlich weniger MCAT Motive durch die Transkriptionsfaktoren gebunden, wenn eine Inkubation mit den VITO Proteinen erfolgt. Da ein direktes Binden der MCAT Motive an die VITO Proteine ausgeschlossen werden konnte, musste die beobachtete Verringerung der MCAT Bindung durch die TEF Proteine folglich auf einen Einfluss der potentiellen Cofaktoren zurückzuführen sein. Zur Kontrolle dieser Behauptung wurde das Experiment mit einem anderen Transkriptionsfaktor (Myf5) wiederholt, der nachweislich keine Interaktion mit den TEF Faktoren eingeht. Wie erwartet, konnte hier keine Veränderung in den Bindungseigenschaften von TEF-1 beobachtet werden. In einem weiteren Vorversuch wurde zudem der Einfluss des mVITO-1 Proteins auf die Interaktion des E2-2 Transkriptionsfaktors mit dem MCK Oligonukleotid untersucht (Apone und Hauschka 1995), wobei keine Veränderung in der Bindungsaffinität des E2-2 zu verzeichnen war. Dies schließt eine generelle Beeinflussung der Bindungseigenschaften zwischen Transkriptionsfaktoren und ihren Bindemotiven durch die VITO Proteine oder durch Reste des *in vitro* Translationsansatzes aus und belegt die Spezifität der gewonnenen Ergebnisse. Aus den *Bandshift* Experimenten mit mVITO-2 kann noch eine weitere Schlussfolgerung gezogen werden, denn in diesen Versuchen wurden zusätzlich die trunktierten mVITO-2 Expressionskonstrukte verwendet. Die Verringerung der MCAT/TEF-1 Komplexbildung kann hier nur bei den Konstrukten mit vollständiger cDNA bzw. den C-terminal verkürzten VITO-2 Proteinen beobachtet werden. Bei Verwendung des Expressionskonstrukts mit deletierter SID bleibt die Menge an gebundenen MCAT Motiven hingegen unverändert. Daraus kann eindeutig abgeleitet werden, dass die Beeinflussung der DNA-Bindeeigenschaften von TEF-1 durch eine direkte Wechselwirkung mit den VITO Proteinen erfolgt und dazu die SID von entscheidender Bedeutung ist. In weiteren Versuchen fanden sich zusätzlich auch Hinweise für eine unterschiedlich starke Bindungsaffinität zwischen TEF-1 und den VITO Proteinen, denn nachweislich führt die Zugabe von mVITO-2 zu einem bestehenden mVITO-1/TEF-1 Komplex zu einer weiteren Abnahme an gebundenen MCAT Motiven, während im umgekehrten Fall keine Beeinflussung erfolgt. Zusammen mit den Erkenntnissen aus den Co-Immunopräzipitationen wäre ein Modell denkbar, wie es schematisch in Abbildung 46 dargestellt ist. Demnach wäre mVITO-2 nur durch eine Homo- oder Heterodimerbildung in der Lage, das TEF-1 zu binden, während mVITO-1 bereits als Monomer zur Interaktion fähig ist. Dies würde die Beobachtungen aus den Co-Immunopräzipitationen erklären, wonach mVITO-1 immer eine größere Menge von TEF-1 präzipitieren kann als mVITO-2. Das Modell würde zudem die Ergebnisse des Kompetitions-*Bandshifts* erklären, da die Zugabe von mVITO-2 zum bestehenden mVITO-1/TEF-1 Komplex zur Bildung eines Heterodimers führen könnte, der zu einer weiteren Veränderung der DNA-Bindeeigenschaften der TEA/ATTS Domäne führt (Abbildung 46, A). Im Gegensatz dazu, würde die zusätzliche Inkubation von mVITO-1 mit einem mVITO-2/TEF-1 Komplex keine Verdrängung von mVITO-2 hervorrufen und damit zu keiner Veränderung im *Bandshift*



führen (Abbildung 46B). Unterstützt wird dieses Modell durch die Arbeiten von Halder und Carroll, die ebenfalls in *Bandshift* Experimenten eine Bildung von multimeren Komplexen der homologen *Drosophila* Proteine Scalloped und Vestigial nachweisen konnten (Halder und Carroll 2001). Für die Überprüfung dieser Hypothese sind jedoch weitere Konstrukte notwendig, die verschiedene Deletionen sowie Substitutionen ausgewählter Bereiche zwischen mVITO-1 und mVITO-2 besitzen.

Ebenso ungeklärt bleibt die genaue Ursache für die Verringerung der MCAT Bindung in TEF-1. Wahrscheinlich wird die inhibierende Wirkung der VITO Proteine durch eine Konformationsänderung im TEF-1 ausgelöst, die eine Veränderung der Bindungseigenschaften der TEA/ATTS zur Folge hat. Ob die DNA-Bindung dabei entweder teilweise oder völlig unterdrückt wird, kann nicht eindeutig bestimmt werden, da die verbleibenden detektierten MCAT Signale von einer verringerten Menge an gebundenen Oligos stammen können oder auf einen Rest von TEF-1 Proteinen, die nicht mit den Cofaktoren interagiert haben, zurückzuführen sind. Die Konformationsänderung könnte jedoch auch in einer Änderung des favorisierten Bindemotivs der TEA Domäne resultieren. In diesem Fall würde die Selektivität der TEF Faktoren für bestimmte Promotoren durch die VITO Proteine verändert werden. Für diese Hypothese sprechen auch die Ergebnisse der *Bandshifts* mit multiplen MCAT Bindemotiven. Diese wurden durchgeführt um die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse zwischen den Zellkulturversuchen und den *Bandshifts* mit singulären MCAT Motiven zu klären. Es zeigte sich dabei, dass die beobachtete Verringerung der Bindungsaffinität ausschließlich auf die Einzel-MCAT-Motive beschränkt bleibt. Diese Beobachtung erklärt gleichzeitig, warum in den Transaktivierungsversuchen mit den singulären MCAT Sequenzen nur eine vergleichsweise geringe Aktivierung TEF-abhängiger Reporter erfolgte. Es ist also denkbar, dass die Steuerung der TEF-abhängigen Transkription durch die VITO Proteine, über einer Veränderung der Affinität der Transkriptionsfaktoren von Promotoren mit einzelnen MCAT Sequenzen zu Promotoren mit multimeren MCAT Motiven, gesteuert wird. Auf Grund der Expression der VITO Proteine in frühen embryonalen Stadien, speziell in den Somiten, kann vermutet werden, dass die VITO Proteine durch die Regulation der TEF-Bindungseigenschaften und

der daraus folgenden Regulation muskelspezifischer Gene maßgeblich an der Steuerung der embryonalen Muskelentwicklung beteiligt sind.

Chen und Mitarbeiter, die in ihrer Publikation die Verringerung der MCAT Bindung durch TEF-1 nach Inkubation mit mVITO-1 (Vgl-2) bestätigen konnten, ziehen aus den Ergebnissen eine andere Schlussfolgerung. Mit den von Ihnen verwendeten MCAT-Oligonukleotiden zeigt sich mit TEF-3 eine deutlich stärkere Wechselwirkung, die nach zusätzlicher Inkubation mit mVITO-1 (Vgl-2) nicht abgeschwächt wird (Chen *et al.* 2004). In *Bandshift* Experimenten mit differenzierenden C₂C₁₂ Zellen, wurde zudem eine Verschiebung der MCAT Bindung von TEF-1 zu TEF-3 beobachtet. Die Autoren deuten diese Ergebnisse als Folge einer Phosphorylierung des TEF-1 während der Differenzierung und einer daraus resultierenden höheren Affinität zu mVITO-1. Der regulatorische Einfluss von mVITO-1 während der Muskeldifferenzierung erfolgt nach Meinung von Chen und Mitarbeitern demnach nicht durch eine generelle Veränderung der Selektivität der TEFs gegenüber muskelspezifischen Bindemotiven, sondern durch Verminderung der TEF-1 abhängigen Transkription. Auf Grund des, von den Autoren beobachteten, fehlenden negativen Einflusses von mVITO-1 gegenüber TEF-3, würde daraus eine indirekte TEF-3 spezifische Genaktivierung resultieren.

Es kann also festgestellt werden, dass auch durch die *Bandshift* Experimente eine Funktion der VITO Proteine, als Cofaktoren der TEFs nachgewiesen werden konnte. Die Interaktion führt zu einer spezifischen Verringerung der Bindung von TEF-1 an MCAT Motive, wobei noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, worauf diese Veränderung der Bindungseigenschaften der TEA/ATTS Domäne zurückzuführen ist. Vermutlich kommt es jedoch zu einer Veränderung des Bindemotivs oder einer vollständigen Unterdrückung der DNA-Interaktion. Ferner unterstützen die Ergebnisse des Kompetitions-*Bandshifts* zwischen mVITO-1 und mVITO-2 ein Modell der heteromeren TEF/VITO Komplexbildung, das eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der beiden Cofaktoren in den Co-Immunpräzipitationen liefern kann.

Gleich welches der entwickelten Modelle für die Beeinflussung der TEF-abhängigen Genregulation durch die VITO Proteine sich in Zukunft als richtig herausstellen sollte, konnte in dieser Arbeit bereits als Folge der Interaktion eine Erhöhung in der Aktivität MCAT abhängiger Promotoren festgestellt werden. Vermutlich erfolgt diese Aktivierung, wie von Chaudhary und Mitarbeitern bereits postuliert, durch die Verdrängung eines TEF-spezifischen Korepressors durch die VITO Proteine (Chaudhary *et al.* 1994). So war nach der Cotransfektion von TEF-1 und mVITO-1 eine bis zu 30fache Erhöhung der Reporteraktivität messbar, die auch von Maeda *et al.* in weiteren Zelllinien bestätigt werden konnte (Maeda *et al.* 2002). Im Falle des mVITO-2 war ebenfalls eine Erhöhung der Luciferaseaktivität feststellbar, die gegenüber mVITO-1 zwar etwas geringer war, dafür jedoch auch mit TEF-3 erfolgte. Die Ergebnisse der *Bandshift* Experimente würden eigentlich genau das Gegenteil erwarten lassen, da die Interaktion zwischen den TEFs und den VITO Proteinen zu einer verringerten Bindung der TEFs an die MCAT Motive führte. Ein Grund für diese Beobachtungen könnte jedoch die Tatsache sein, dass die Durchführung der *Bandshift* Experimente *in vitro* und der Aktivierungsstudien *in vivo* erfolgte. So könnte es *in vitro* tatsächlich zu einer Abschwächung der Bindungsaffinität der TEFs zu den MCAT

Motiven kommen. Dieser Effekt kann in der lebenden Zelle jedoch durch einen oder mehrere unbekannte Faktoren möglicherweise wieder kompensiert werden. Eine Überprüfung könnte durch eine Wiederholung der *Bandshift* Experimente mit einem Proteinextrakt von TEF und/oder VITO exprimierender Zellkulturen erfolgen. Wird die Abnahme an gebundenen MCAT Motiven dann nicht mehr beobachtet, deutet dies auf einen weiteren beteiligten Faktor hin, welcher den negativen Einfluss der VITO Proteine kompensiert und die DNA-Bindung der TEFs wieder stabilisiert.

Ebenso muss bei einem Vergleich der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass in den EMSA Experimenten nur Oligonukelotide mit einer einzelnen Kopie des MCAT Motivs verwendet wurden. Die größten Steigerungen der Luciferaseaktivität sind jedoch in allen Versuchen mit einem 4fach wiederholten MCAT Motiv beobachtet worden. Bei Verwendung eines Reporterkonstrukts mit den den Motivsequenzen der *Bandshift* Experimente, ist die Rate der Transaktivierung durch mVITO-1 um fast eine Zehnerpotenz und bei mVITO-2 um ca. die Hälfte verringert. Daher wäre eine mögliche Schlussfolgerung, dass eine multiple Anzahl von MCAT Motiven die Bindung der TEFs stabilisiert und die VITO vermittelte Transaktivierung über die, in diesem Kontext sehr gering ausgeprägte Reduktion der Bindungsaffinität dominiert. Ferner wäre es auch möglich, dass die Abnahme der Bindungsaffinität zur MCAT Bindestelle die Initiation und Prozession der Transkription erst ermöglicht. Vergleicht man die Stärke der Transaktivierung zwischen den VITO Proteinen, so ist auch hier ein Unterschied zwischen den Cofaktoren sichtbar. Während die Luciferaseaktivität durch mVITO-1 um bis zu 30fach erhöht werden kann, sind die maximalen Signale bei mVITO-2 nur ca. 13mal so stark wie die Hintergrundaktivität. Diese Beobachtungen korrelieren mit den vorangegangenen Ergebnissen der EMSA Experimente und der Co-Immunopräzipitationen, wonach ebenfalls eine geringere Wechselwirkung von mVITO-2 gegenüber mVITO-1 verzeichnet wurde. Somit fügen sich auch die Resultate der Transaktivierungsversuche in das postulierte Modell der nicht-äquimolaren Interaktion zwischen TEF-1 und den VITO Proteinen ein (siehe Abbildung 46). Demnach wären für eine äquivalente Transaktivierung MCAT-abhängiger Reporter durch mVITO-2 mehr Moleküle notwendig, als nach einer Stimulation durch mVITO-1. Da in den Transfektionsansätzen jedoch stets gleiche Mengen DNA verwendet wurden, ist anzunehmen, dass auch annähernd die gleiche Anzahl an Proteinen synthetisiert wurde und dadurch die Transaktivierung durch mVITO-2 in einem geringeren Maße erfolgt.

Es konnte somit erfolgreich gezeigt werden, dass weder die VITO Proteine noch die TEFs allein zur Aktivierung MCAT-abhängiger Reporter fähig sind. Dagegen ist nach einer VITO/TEF Interaktion, trotz der daraus resultierenden Abnahme der Bindung der TEFs an isolierte MCAT Motive, eine deutliche Erhöhung der Reporteraktivität in verschiedenen Zellen zu beobachten. Ferner konnte am Beispiel des mVITO-2 gezeigt werden, dass für diese Transaktivierung die Existenz der SID unbedingt notwendig ist. Daraus kann geschlossen werden, dass die VITO Proteine durch die SID als Cofaktoren an der MCAT-abhängigen Genregulation der TEFs beteiligt sind. Ob die Veränderung der DNA-Bindeeigenschaften der TEA/ATTS Domäne in den TEFs dabei eine Rolle spielt, oder nur einen sekundären Effekt widerspiegelt, konnte im Rahmen der Arbeit nicht eindeutig geklärt werden.

6.5. Die mVITO-2 defiziente Mauslinie zeigt keine Beeinträchtigungen in lebensnotwendigen Körperfunktionen

Trotz des beobachteten temporären und gewebspezifischen Expressionsmusters der VITO Proteine während der Embryogenese und der eindeutigen biochemischen und funktionellen Eigenschaften, zeigen die homozygoten *mVITO-2 Knock Out* Mutanten keinen letalen Phänotyp und keine Auffälligkeiten während der postnatalen Entwicklung. Das Gleiche gilt für die, in unserer Arbeitsgruppe, generierten *mVITO-1^{LacZ} Knock In* Mäuse, in denen die Genfunktion von *mVITO-1* durch die Insertion eines β -Galaktosidase Transgens ausgeschaltet wurde (Schneider *et al.* unveröffentlicht). Diese Beobachtung erscheint sehr ungewöhnlich, da neben den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen, von Mitarbeitern der AG Braun und weiteren Arbeitsgruppen noch zusätzliche Erkenntnisse gewonnen werden konnten, die eine Involvierung der VITO Proteine in entscheidende Entwicklungsprozesse vermuten lässt. So wurde durch einen Morpholino vermittelten *Knockdown* der beiden *VITO* Gene die Bildung terminal differenzierter Myotuben in Zellkultur blockiert (Chen *et al.* 2004; Mielcarek *et al.* unveröffentlicht). Eine Injektion der mVITO-1 (Vgl-2) Morpholinos in Hühnchenembryonen zeigte darüber hinaus eine Blockade der Expression für die schwere Kette des Myosins, was die Beteiligung von mVITO-1 an der Differenzierung der Skelettmuskulatur vermuten lässt (Chen *et al.* 2004). Auf Grund der Expressionsmuster der *VITO* Gene und weiterer Translokationsexperimente in der Zellkultur kann zudem vermutet werden, dass mVITO-1 zu Beginn der Muskelentwicklung benötigt wird, während mVITO-2 scheinbar hauptsächlich in der terminalen Differenzierung involviert ist (Mielcarek *et al.* unveröffentlicht). Von Brandenberger und Mitarbeitern konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Expression eines human Homologs vom *mVITO-2* in differenzierenden embryonalen Stammzellen erhöht ist (Brandenberger *et al.* 2004).

Ein Grund für das Fehlen eines offensichtlichen Phänotyps kann die Tatsache sein, dass auf Grund einer teilweisen Überlappung der Expressionsmuster und der starken Homologie innerhalb der SID eine Kompensation zwischen den beiden Mitgliedern der VITO Genfamilie erfolgt. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde bereits damit begonnen, die *mVITO-1^{LacZ}* und *mVITO-2^{delta}* Mäuse zu verkreuzen, um Doppelmutanten zu erzeugen. Zum Ende dieser Arbeit waren jedoch noch keine doppelt homozygoten Tiere aus den Verpaarungen hervorgegangen, weshalb eine Analyse dieser Tiere noch nicht erfolgen konnte. Da für das *mVITO-2* eine konditionelle *Knock Out* Strategie gewählt wurde, kann im Falle eines letalen Phänotyps der Doppelmutanten auch eine zeitliche und gewebspezifische Ausschaltung des mVITO-2 erfolgen. Für diesen Versuchsansatz wurde ebenfalls mit der Verkreuzung der *mVITO-2cKO* Mauslinie begonnen. Wie die *in silico* Analyse potentieller weiterer Kandidaten der VITO Genfamilie zeigt (siehe 6.3. und Abbildung 46), ist es durchaus möglich, dass weitere VITO-verwandte Proteine existieren, welche ebenfalls zur Kompensation des mVITO-1 bzw. mVITO-2 Phänotyps führen. Ein solcher Kandidat könnte z.B. der *vestigial related* Faktor sein, zu dem, wie bereits erwähnt, erste Expressionsanalysen erfolgt sind und die Generierung eines Mausmodells begonnen wurde.

Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der eingeführten Deletion im *mVITO-2* Locus um keinen vollständigen Verlust der Genfunktion handelt. Zur Überprüfung müssen Expressionsanalysen analog den generierten Pax7 Mutanten erfolgen (siehe 5.2.). Da für das *mVITO-2* bislang noch kein Antikörper zur Verfügung steht, kann sich diese Analyse jedoch nur auf RNA Ebene beschränken.

6.6. Verschiedene niedermolekulare Substanzen aus einer LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek fördern die terminale Differenzierung der Maus Myoblasten-Zelllinie C₂C₁₂

Niedermolekulare synthetische Moleküle (*engl.: small molecules*) sind Substanzen, die ungehindert in Zellen eindringen können und dort die Funktionen spezifischer Zielproteine beeinflussen können. Aufgrund dieser Eigenschaften stellen diese Substanzen ein hilfreiches Werkzeug dar, das bei der Suche nach neuen therapeutischen Stoffen in der Pharmakologie sowie zum Verständnis grundlegender Funktionen in der Zellbiologie dient. Auch natürliche Toxine, die z.B. Actin und Tubulin mit hoher Spezifität und Affinität beeinflussen, können eine solche Schlüsselrolle einnehmen, und im genannten Beispiel der Erforschung des Zytoskeletts behilflich sein (Cooper 1987; Jordan *et al.* 1998; Patocka und Strunecka 1999). Daher wurde schon seit Beginn des 19. Jahrhunderts damit begonnen, neuartige niedermolekulare Substanzen auf potentielle therapeutische Eigenschaften zu überprüfen. Die Stoffe kamen dabei aus zwei verschiedenen Quellen; (1) synthetisch generierte Substanzen aus der Pharmaindustrie und (2) natürliche Quellen - Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen. Die bedeutendste Herausforderung in dieser „chemischen Genetik“, ist dabei die Entdeckung eines Moleküls, das entweder eine gegebene Proteinfunktion oder einen spezifischen biologischen Phänotyp (physiologischen Effekt) selektiv verändern kann (Spring 2005; Smukste und Stockwell 2005; Alaimo *et al.* 2001; Walsh und Chang 2006; Schreiber 2003). Die Identifikation solcher Stoffe kann durch ein systematisches Screening einer großen Anzahl von niedermolekularen Substanzen (HTS, *engl.: high-throughput screening*) ermöglicht werden. Dafür stehen mittlerweile drei unterschiedliche Versuchsmethoden zur Verfügung: auf der Ebene der Proteine (z.B.: Affinitäts-Chromatographie, NMR, Massenspektrometrie, FRET), der Zellen (z.B.: Immunabsorption, Reporter-gen-Assays) oder gesamter Organismen (z.B.: phänotypische Untersuchungen).

In dieser Arbeit konnte durch ein Screening einer LOPAC¹²⁸⁰ Stoffbibliothek eine Reihe von Substanzen identifiziert werden, welche die Differenzierung der Myoblasten Zelllinie C₂C₁₂ beeinflussen. Einige dieser Substanzen zeigen dabei nur morphologische Veränderungen, während andere eindeutig zur terminalen Differenzierung zu Myotuben führen. Die Analyse erfolgte dabei in 3 Stufen: (1) eine enzymatische Selektion durch Messung der Muskel-Kreatin-Kinase Aktivität, (2) eine optische Auswertung einiger ausgewählter Kandidaten und (3) ein Nachweis der Myotubenbildung durch einen muskelspezifischen Antikörper.

Innerhalb des ersten Selektionsschritts konnten insgesamt 40 Substanzen identifiziert werden, die eine Erhöhung der MCK-Aktivität zeigten. Jene Stoffe, welche den stärksten Anstieg in der Enzymaktivität aufwiesen und kommerziell erhältlich waren, wurden anschließend für weitere Untersuchungen ausgewählt. An diesem Punkt des Screenings sind sicherlich die meisten Möglichkeiten gegeben, um noch weitere Kandidaten zu identifizieren. So könnte eine Ausweitung der eingesetzten Konzentrationen der Bibliothek weitere Substanzen offen legen, die in den bislang verwendeten Stoffmengen entweder noch zu gering konzentriert waren, um einen Einfluss auf die Differenzierung zu haben, oder bereits eine für die Zellen letale Dosis überschritten hatten. Des Weiteren waren die, durch die Verwendung des 96-well Formats bedingte, verhältnismäßig kleine Adhäsionsoberfläche und die geringen Volumina dafür verantwortlich, dass sich die Selektion der Kandidaten für die zweite Stufe des Screenings als sehr schwierig herausstellte, da die Unterschiede in der MCK Aktivität zwischen den potentiell positiven Substanzen und den Kontrollen nur sehr gering waren (siehe Abbildung 41). Trotz dieser Tatsache konnte im anschließenden mikroskopischen Screening von den 33 ausgewählten Stoffen, in 16 Fällen tatsächlich eine morphologische Veränderung der C₂C₁₂ Zellen beobachtet werden, was die generelle Funktionalität des anfänglichen Screenings unterstreicht. Die restlichen 17 Substanzen zeigten dagegen keine Auswirkung auf die Myoblasten oder wirkten toxisch und sind vermutlich auf Fehlinterpretationen der Ergebnisse der MCK Messung zurückzuführen. Da die Substanzen der LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek in DMSO gelöst waren und bereits durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen ein Einfluss des Lösungsmittels auf die Proliferation und Differenzierung verschiedenster Zelllinien gezeigt werden konnte, bestand die Vermutung, dass die beobachteten Veränderungen der C₂C₁₂ Zellen allein durch das DMSO ausgelöst wurden (Collins *et al.* 1978; McBurney und Rogers 1982; Wang und Scott 1993; Ai *et al.* 1995; Tsai *et al.* 1996). Die Kontrollversuche mit entsprechenden Mengen des Lösungsmittels, die ebenfalls mit den Zellen inkubiert wurden, zeigten tatsächlich geringe Veränderungen in der Morphologie, die jedoch nicht mit den beobachteten Synzytienbildungen der anderen Substanzen vergleichbar waren. Die MCK Messung zeigte dagegen auch einen deutlichen Anstieg der Proteinaktivität in den DMSO behandelten Zellen, was vermutlich ein weiterer Grund für die relativ hohe Anzahl an falsch-positiven Treffern im ersten Selektionsschritt ist. Dennoch lässt sich diese Beeinflussung nur für eine (PD 98,059) der 16 Substanzen mit morphologischen Auffälligkeiten ausschließlich auf das Lösungsmittel zurückführen, denn entweder wurden die Stoffe, die ähnliche Veränderungen wie das DMSO auslösten, auf eine andere Art und Weise in Lösung gebracht oder wiesen keine Erhöhung der MCK Aktivität auf.

Erstaunlicherweise konnte für 8 der Substanzen, die im zweiten Selektionsschritt keine Auffälligkeiten zeigten, trotzdem eine erhöhte MCK Aktivität nachgewiesen werden, was wahrscheinlich erklärt, warum diese Stoffe im ersten Screening als positiv identifiziert wurden. Da drei dieser Substanzen im zweiten Screening ebenfalls in DMSO gelöst wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Beeinflussung der MCK Aktivität durch das Lösungsmittel bewirkt wurde. Die anderen Stoffe wurden

dagegen in Wasser oder Alkohol gelöst, weshalb der Einfluss von DMSO hier ausgeschlossen werden kann und die Erhöhung der MCK Aktivität somit direkt oder indirekt von den Substanzen ausgelöst worden sein muss. Es bleibt jedoch in diesen Fällen ungeklärt, ob der Anstieg der MCK Aktivität bereits eine Initiierung der terminalen Differenzierung darstellt, welche z.B. durch das Fehlen von weiteren Faktoren oder Stimuli jedoch nicht vollständig durchgeführt wird. Ebenso wäre es möglich, dass Veränderungen in der MCK Aktivität nur ein sekundärer Effekt ist, ausgelöst durch Aktivierung von Signalwegen, welche nicht mit der Myotubenbildung einhergehen. Lediglich das *Corticosterone*, welches in Ethanol gelöst wurde, lässt einen zusätzlichen Einfluss des Lösungsmittels vermuten, da auch von Ethanol ausgelöste Veränderungen der Proliferation und Differenzierung nachgewiesen werden konnten, wobei diese Beeinflussung bislang hauptsächlich als inhibitorischer Effekt beschrieben wurde (Garriga *et al.* 2000; Johnson *et al.* 2004; Tateno *et al.* 2004).

Im Gegensatz zu den teilweise widersprüchlichen Ergebnissen in der mikroskopischen Auswertung und der MCK Messung der Substanzen ohne eindeutigen Effekt auf die terminale Differenzierung der Myoblasten, lässt sich in allen Ansätzen, in denen auch eine Bildung von Synzytien beobachtet wurde, eine erhöhte MCK Aktivität nachweisen. Diese Beobachtung beweist, dass die Messung der MCK Aktivität tatsächlich zur Bestimmung des Differenzierungsgrades der C₂C₁₂ Zellen verwendet werden kann. Zusätzlich konnte durch den immunhistochemischen Nachweis der schweren Kette des Myosins durch den MF20 Antikörper eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei der beobachteten Synzytienbildung, um Myotuben handelt und somit tatsächlich eine Förderung der terminalen Differenzierung von Muskelvorläuferzellen durch die selektierten Stoffe gezeigt werden konnte (Dow und Stracher 1971; Sréter *et al.* 1971).

Für die meisten der identifizierten Substanzen lassen sich in der Literatur bislang noch keine Hinweise auf eine Involvierung in Differenzierungsprozesse myogener Zelllinien finden. Einzige Ausnahme stellen die selektierten Glukokortikoide *Betamethasone*, *Triamcinolone* und *Hydrocortisone* dar. Für die einzelnen Substanzen erfolgte zwar bislang noch kein Bericht über eine mögliche Beeinflussung der terminalen Differenzierung, jedoch konnte für *Dexamethasone* - einem weiteren Vertreter dieser Stoffgruppe, der nicht in der Bibliothek enthalten war - bereits eine Erhöhung der MCK-Aktivität und beschleunigte Myotubenbildung der C₂C₁₂ Myoblasten nachgewiesen werden (Montano und Lim 1997). Diese Untersuchungen fanden allerdings - anders als in der vorliegenden Arbeit - ausschließlich unter Differenzierungsbedingungen statt und zeigten somit keine Induktion der terminalen Differenzierung. In der Ratten Myoblastenzelllinie L6 konnte zudem ein synergetischer Effekt von *Dexamethasone* zusammen mit Insulin auf die Differenzierung beobachtet werden (Ball und Sanwall 1980). Für die isolierten Glukokortikoide in der LOPAC Bibliothek wurde bislang lediglich ein Einfluss auf verschiedene andere Differenzierungsprozesse nachgewiesen. So wurden für das *Betamethasone*, das bislang als Medikament zur Behandlung von *Psoriasis* (Schuppenflechte) Anwendung findet (Charakida *et al.* 2006), positive Effekte auf die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten und Präadipozyten gezeigt (Grégoire *et al.* 1991; Tomlinson *et al.* 2006). Die *Psoriasis* ist jedoch mit einer

signifikanten Reduktion der Kreatin-Kinase-Aktivität verbunden, weshalb die therapeutische Wirkung des *Betamethasones* möglicherweise auf einer Aktivierung der MCK beruht und das Glukokortikoid nur deshalb in dem Screening detektiert wurde (Rassner 1973). Für das *Hydrocortisone* wurde ebenfalls eine Stimulation der Kerationozytendifferenzierung nachgewiesen (Ponec und Boonstra 1987). Weiterhin führt eine Zugabe von *Hydrocortisone* zu einer Zunahme der Differenzierung von Osteoblasten (Ireland *et al.* 2004) sowie Melanoblasten (Hirobe 1996), und scheint wiederum zusammen mit Insulin für eine korrekte neuronale Differenzierung verantwortlich zu sein (Aizenman und de Vellis 1987; Poduslo *et al.* 1990). Ob die beiden Glukokortikoide in der Vergangenheit schon einmal auf eine mögliche Beeinflussung der Differenzierung von Myoblasten getestet wurden und hier möglicherweise eine neue Eigenschaft einzelner oder aller Glukokortikoide festgestellt werden konnte, kann im Kontext der vorliegenden Publikationen jedoch nicht eindeutig geklärt werden, wobei die Untersuchungen, die mit *Dexamethasone* durchgeführt wurden, diese Möglichkeit jedoch nahelegen. Für das dritte detektierte Glukokortikoid *Triamcinolone* lässt sich in der Literatur (außer für das Acetonid-Salz des Hormons) bisher kein Hinweis auf eine Involvierung in Differenzierungsprozesse finden. Es wird dagegen berichtet, dass *Triamcinolone* und das verwandte *Prednisolone*, eingesetzt zur Behandlung der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), zu Gewichtsverlusten zusammen mit einer Schwächung der Muskulatur führt (Tobin 1988; Hamilton *et al.* 1995; Gosselink *et al.* 1996). In weiteren Untersuchungen konnte weiter gezeigt werden, dass das Glukokortikoid zu einer vorwiegenden Atrophie der Typ-IIx/b-Fasern führt und in Veränderungen des Karbohydrat-Metabolismus und einem erhöhten Glykogenspiegel innerhalb der Muskulatur resultiert (Dekhuijzen *et al.* 1995; Petrof *et al.* 1995; Koerts-de Lang *et al.* 1998, 2000). Diese erhöhte Glukoseaufnahme kann jedoch auch mit einem Kalzium Influx verbunden sein (Eilam und Othman 1990; Batts 2002; Lees und Williams 2003), der wiederum für die Differenzierung und Fusion von Myoblasten bzw. Myoblasten und Myotuben notwendig ist (Shainberg *et al.* 1969). Möglicherweise können die Glukokortikoide durch metabolische Veränderungen der Myoblasten während der frühen Myogenese eine fördernde Wirkung haben, die jedoch später im adulten Muskel zu einem negativen Einfluss führt. Ob dabei der Glukose- bzw. Kalzium-Influx Ursache oder Auswirkung ist, kann jedoch nur vermutet werden. Ein denkbarer Ansatz zur Klärung der Hypothese, wäre eine Applikation der Glukokortikoide in ein lebendes System und die Beobachtung möglicher Veränderungen während der embryonalen Myogenese. Als geeignetes Untersuchungsobjekt würden sich z.B. Hühnchenembryonen anbieten, da eine Injektion der Substanzen in befruchtete Eier und eine anschließende gute Beobachtung der Entwicklungsprozesse *in ovo* möglich ist.

Die Hypothese der erhöhten Kalzium-Konzentration bedingt durch einen Ca-Influx würde auch eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse der Kontrollversuche mit dem DMSO liefern, da die Inkubation des Lösungsmittels mit verschiedenen Zelltypen ebenfalls eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen auslösen kann (McBurney 1993; Morley und Whitfield 1993; Wilton und Skerjanc 1999). Da die MCK auch mit dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) assoziiert ist und

Hinweise auf eine Beteiligung beim Kalziumtransport in das SR bestehen, ist es durchaus denkbar, dass auch im umgekehrten Fall - bei einer Veränderung/Auslösen des Ca-Influx - eine Modifikation der MCK-Aktivität erfolgen kann (Baskin und Deamer 1970; Rossi *et al.* 1990). Die Erhöhung der MCK Messwerte würde in diesem Fall somit durch die Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen ausgelöst werden und ist kein Hinweis auf eine beginnende Differenzierung.

Eine Veränderung des Kohlenhydratstoffwechsels wurde ebenfalls bei dem Polyamin *Putrescine* (1,4-Diaminobutan) beobachtet (Shelepov *et al.* 1990). Bei den Untersuchungen von Shelepov und Mitarbeitern zeigte sich darüber hinaus nach einer Applikation hoher Mengen an *Putrescine* in Ratten ein ähnlicher Anstieg der intramuskulären Glykogenkonzentrationen, der mit dem Effekt der kombinierten Administration von Insulin und Glukokortikoiden vergleichbar war (siehe Glukokortikoide↑ und Koerts-de Lang *et al.* 1999). Daher ist anzunehmen, dass der Effekt von *Putrescine* höchstwahrscheinlich auf dem gleichen metabolischen Mechanismus beruht, wie die der Glukokortikoide. Darüber hinaus spielen die Polyamide eine große Rolle in verschiedenen genetischen Grundmechanismen, wie DNA-Synthese und Genexpression und steuern somit auch Schlüsselprozesse wie Zellmigration, Proliferation und Differenzierung in Tieren und Pflanzen (Jänne *et al.* 2004). Für das *Putrescine* Derivat *Spermin*, das im Stoffwechsel durch Alkylierung der beiden Aminogruppen durch die Spermidin Synthase und dekarboxyliertes S-Adenosylmethionin gebildet wird, konnten zudem differenzierungsfördernde Eigenschaften nachgewiesen werden. In einer kürzlich erschienenen Publikation von Toshiya und Mitarbeitern konnte durch die Inkubation von ES-Zellen mit *Spermin* die Bildung eines mehrschichtigen Muskelzellverbands beobachtet werden (Sasaki *et al.* 2008). Zwar wird von den Autoren diese Eigenschaft ausschließlich für das *Spermin* beschrieben; jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass nach der Zugabe eine Umwandlung in die Derivate *Putrescine* und *Spermidin* durch den gewöhnlichen Aminosäurestoffwechsel der Zellen stattfindet.

9-Cyclopentyladenine ist ein Inhibitor der Adenylatcyclase, die für die Synthese des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) verantwortlich ist. Seit einiger Zeit ist bereits bekannt, dass eine Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen des sekundären Botenstoffs cAMP zu einer Blockade der Myogenese führt (Wahrman *et al.* 1973; Winter *et al.* 1993). Dies geschieht entweder durch Inhibition des endogenen Myogenins bzw. durch Senkung der Transkriptionsaktivität des Myogenin-Promoters (Salminen *et al.* 1991). Somit könnte die stimulierende Wirkung des *9-Cyclopentyladenine* auf die terminale Differenzierung durch eine Senkung des intrazellulären cAMP Spiegels und einer dadurch gesteigerten Aktivität des Myogenins erklärt werden. Diese Vermutung könnte jedoch nur durch eine Wiederholung der Versuche mit weiteren Inhibitoren der Adenylatcyclase (z.B.: MDL-12330A, SQ-22536) bestätigt werden, da in der verwendeten LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek, neben dem *9-Cyclopentyladenine*, keine weiteren Adenylatcyclase-Inhibitoren vorhanden sind. Indirekt wird die Beobachtung jedoch bereits von der Tatsache unterstützt, dass der, in der LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek vorhandene Inhibitor der Phosphodiesterase IV (PDE4) *Ibudilast* keine Stimulation der Myogenese zeigt. Dieser Inhibitor greift in den gleichen Signalweg wie *9-Cyclopentyladenine* ein, führt jedoch zu

einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration bzw. zur Aktivierung der Protein Kinase A und blockiert somit die terminale Differenzierung von Myoblasten (Naro *et al.* 1999).

Für die restlichen Substanzen, die im Screening identifiziert wurden, lassen sich mit Hilfe der vorhandenen Publikationen bislang noch keine eindeutigen Verbindungen zu den Vorgängen während der Myoblastenfusion bzw. der terminalen Differenzierung herstellen. Für Derivate der *Vanillic Acid*, welche gewöhnlich als Aromastoff verwendet werden, konnte bislang nur eine Funktion als Inhibitor der Protein Tyrosinphosphatase 1B (PTP1B) nachgewiesen werden (Feng *et al.* 2007). Darüber hinaus wird der *Vanillic Acid* eine antioxidative und antimikrobiologische Wirkung zugeschrieben (Watzl und Leitzmann 1999; Delaquis *et al.* 2005).

S(-)-Timolol gehört zur Gruppe der lipophilen Inhibitoren von β -Adrenozeptoren (β -Rezeptorblocker, β -Sympatholytika; im allgemeinen Sprachgebrauch meist als β -Blocker bezeichnet), welche bevorzugt über β 1-Rezeptoren ablaufen und als Behandlung für folgende Hauptindikationen etabliert sind: Koronare Herzkrankheit (KHK), Herzrhythmusstörungen, Hypertonie, Herzinsuffizienz und funktionelle Herz/Kreislauf-Störungen. Des Weiteren hat sich *S(-)-Timolol* auch bei der Therapie des Glaukoms (Grüner Star) bewährt (Griffin *et al.* 2004). *Ciprofibrate* ist ein Agonist des Peroxysom Proliferator Aktivierten Rezeptors (PPAR), der die Expression von Faktoren der peroxysomalen Beta-Oxidation und der Cytochrom P-450 Familie aktiviert und in die Metabolisierung von Lipiden involviert ist (Hong und Yun 1998). Auf Grund dieser Eigenschaften wird es bislang in der medikamentösen Behandlung verschiedenster Dyslipidämien verwendet (Betteridge 1993; Kovács *et al.* 2005). Es sind daher auch kaum Publikationen zu finden, die *Ciprofibrate* im Kontext von Muskelvorläuferzellen oder Differenzierungsprozessen diskutieren. Von Bronfman und Mitarbeitern konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass der Peroxysom Proliferator eine erhöhte Differenzierung von HL-60 Leukämiezellen zu Makrophagen bedingt (Bronfman *et al.* 1998). Eine Involvierung in myogene Prozesse wurde bisher noch nicht publiziert. Jedoch wurde in einem kürzlich veröffentlichten Patent die erfolgreiche Behandlung von Skelettmuskeldegenerationen mit Agonisten des PPAR beschrieben und unterstreicht somit die Korrektheit von *Ciprofibrate* als positives Screening-Resultat (Carmeliet 2008).

Für die Stoffe *1-(5-Isoquinolinylnsulfonyl)-3-methylpiperazine dihydrochloride* (H7-dHCl) und *2,3-Butan-edionemonoxime* lassen sich ebenfalls keine Hinweise auf eine Beteiligung an myogenen Differenzierungsprozessen finden. H7-dHCl ist ein Inhibitor der Protein Kinase C (PKC), welche in zellspezifischen Signalkaskaden die Tyrosinreste nachgeschalteter Proteine phosphoryliert. Prozesse, die über diesen Signalweg gesteuert werden, sind z.B. die Kontraktion der glatten Muskulatur, Glykolyse und Glukoneogenese in Hepatozyten und Adipozyten oder Aggregation der Thrombozyten (Rang 2003; Fitzpatrick *et al.* 2004). Die Pharmaindustrie hat eine Reihe von PKC Inhibitoren entwickelt, da eine große Anzahl wichtiger Prozesse innerhalb verschiedener Erkrankungen - insbesondere die Bildung benigner Tumore - durch die Aktivität der Protein Kinase C ermöglicht werden und diese Inhibitoren somit potentielle Krebstherapien darstellen (Yoshiji *et al.*, 1999; Shih *et al.*, 1999). In Zellkulturstudien konnte bislang durch Zugabe von H7-dHCl nur eine Induktion von

morphologischen Veränderungen sowie der Differenzierung von humanen und murinen Neuroblastomazellen beobachtet werden (Miñana et al. 1989; Parodi 1990). In der humanen Leukämiezelllinie HL-60 wurde dagegen von zwei Arbeitsgruppen eine inhibitorische Wirkung von H7-dHCl festgestellt, die mit einer fehlenden PKC Aktivität begründet wurde (Nel et al. 1987; Martell et al. 1989). Das *2,3-Butanedionemonoxime* (BDM) ist ein reversibler ATPase Inhibitor mit Phosphatase-ähnlichen Eigenschaften. Ursprünglich wurde es zur Regeneration der Acetylcholinesterase nach Vergiftung mit Phosphorsäureestern eingesetzt; jedoch stellte sich die dephosphorylierende Wirkung als zu unspezifisch heraus (Xiao und McArdle 1995a). Weitere Untersuchungen zeigten zudem eine signifikante Senkung des Blutdrucks normotoner und hypertensiver Ratten, durch eine temporäre Blockade der Kalziumströme (Xiao und McArdle 1995b) sowie weitere positive Eigenschaften zur Erhaltung und Schutz der Kardiomyozyten nach einem Herzstillstand (Dorman et al. 1996). Diese schützenden Eigenschaften von BDM sind mit einer temporären Reduktion der Kalziumsensitivität der Myofilamente und einer Abschwächung des Kalziumtransienten durch Inhibierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle sowie Veränderung der Expression herzspezifischer Ionenkanäle verbunden (Eisfeld et al. 1997; Jayawant et al. 1999; Habazettl et al. 1998; Voigtlander et al. 1999; Thum und Borlak 2001). Von Tripathy und Mitarbeitern wurde jedoch auch eine Aktivierung der Ryanodin-Rezeptoren in Skelett- und Herzmuskelzellen beobachtet (Tripathy et al. 1999). Die Ryanodin-Rezeptoren sind ebenfalls Kalziumkanäle, die für den Einstrom von Kalziumionen aus dem SR ins Zytosol verantwortlich sind, weshalb auch hier eine mögliche Verknüpfung zur Myoblastendifferenzierung über eine Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen möglich wäre. Im Gegensatz zu den Glukokortikoiden wird für BDM jedoch eine inhibitorische Wirkung im Zusammenhang mit Skelettmuskelzellen beschrieben, wodurch vermutet werden kann, dass eine Veränderung der Kalziumströme in den Myoblasten nicht der einzige bzw. determinierende Auslöser für eine Fusion und Differenzierung ist (siehe Glukokortikoide↑; Higuchi und Takemori 1989; Soeno et al. 1999; Ostap 2002).

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass mit Hilfe eines Kreatin-Kinase Assays mehrere Substanzen identifiziert werden konnten, welche die terminale Differenzierung von C_2C_{12} Myoblasten beeinflussen. Der Nachweis der Differenzierung erfolgte dabei über die immunhistochemische Identifizierung sarkomerer Proteine (MF20 Antikörperfärbung) und die enzymatische Messung von Faktoren der Myotubendifferenzierung (MCK Aktivitätsmessung). Die identifizierten Substanzen umfassen eine Vielzahl von Stoffklassen, welche an den verschiedensten metabolischen Vorgängen und regulatorischen Signalwegen beteiligt sind und dabei als Inhibitoren, Liganden, Agonisten und Antagonisten wirken. Für die meisten Stoffe wurde bislang keine fördernde Wirkung während der Muskelentwicklung oder Regeneration beschrieben, weshalb nach weiterführenden Experimenten und Kontrollen durchaus neuartige therapeutische Anwendungen denkbar wären. Hierzu könnte z.B. eine *in vivo* Applikation der positiv getesteten Substanzen in Hühnchenembryonen durchgeführt werden. Durch die Wiederholung der Experimente mit Derivaten bzw. modifizierten Varianten der positiven

Stoffe könnte zudem eine Eingrenzung der, für die Differenzierung notwendigen, funktionellen Molekülgruppen erfolgen und gleichzeitig geklärt werden, ob die stimulierende Wirkung nur durch einzelne oder sogar eine Gruppe von Substanzen ausgelöst werden kann. Neben diesen Versuchsansätzen wird bereits ein inverses Screening geplant, in dem alle Stoffe identifiziert werden sollen, die eine inhibitorische Wirkung auf die Myotubendifferenzierung besitzen. Neben der Bestimmung der MCK Aktivität ist bei diesem Ansatz jedoch ein zusätzlicher Schritt notwendig, um zytotoxische Effekte von der inhibitorischen Wirkung der Substanzen unterscheiden zu können. Denkbar wäre ein Toxizitätstest (z.B. CytoTox-One™, Promega), der die Zellviabilität durch Bestimmung der Membranintegrität ermittelt. Jedoch funktioniert diese Methode bisher im 96-Well-Format nur unbefriedigend, weshalb das Screening noch nicht begonnen werden konnte.

Da sich das Screening am Beispiel der LOPAC¹²⁸⁰ Bibliothek gut bewährt hat, sind auch weitere Untersuchungen mit anderen Stoffbibliotheken denkbar. Beispielsweise könnte ein analoger Versuch mit einer Naturstoffbibliothek oder einer größeren pharmakologischen Stoffsammlung, kombiniert mit einer roboterunterstützten Hochdurchsatz-Automatisierung, durchgeführt werden.

7. Anhang

7.1. Curriculum vitae



Stefan Günther

*14. März 1978 in Riesa

Ernst-Ludwig-Ring 2
61231 Bad Nauheim
Tel.: 06032/507080
Email: stefan.guenther@mpi-bn.mpg.de

Familienstand

ledig, keine Kinder

Schule

Mittelschule mit Realschulabschluss; Pestalozzi-Schule Riesa
Gymnasium mit Abitur; Werner-Heisenberg-Gymnasium Riesa

Studium

1984-1995

1995-1997

10/1997 - 11/2002

Biologiestudium, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schwerpunkt: Genetik

Nebenfächer: Biochemie

Mikrobiologie

Phytopathologie

Abschluss des Diplom - Studiengangs Biologie

Prüfung und Anfertigung der Diplomarbeit

Studiumsinhalt

Thema der Diplomarbeit: „*Molekulare Charakterisierung von m-VITO1, eines neuen muskelspezifisch exprimierten Gens der Maus*“

Promotion

seit 12/2002

Promotionsarbeit im Labor von Thomas Braun, Institut für physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Wechsel zum Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim

seit 2/2005

7.2. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie zunächst Prof. Dr. Dr. Thomas Braun für das in mich gesetzte Vertrauen während der mittlerweile acht Jahre gemeinsamen Schaffens und das fürsorgliche Heranführen an die Rolle eines Wissenschaftlers. Eine wichtige Rolle spielte dabei auch die Auswahl des Themas für die vorliegende Dissertation, welches sich vor allem zu Beginn der Arbeit als „harte Nuss“ herausstellte. Mit der entsprechenden Rückendeckung und dem geschickten Setzen neuer Impulse konnte diese letztlich dennoch geknackt werden und beginnt nun endlich Früchte zu tragen, welche vermutlich noch weit in meine weitere wissenschaftliche Zukunft reichen werden...

Desweiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Reuter und Prof. Dr. Brand für Ihre Mühe und Zeit bei der Begutachtung dieser Arbeit bedanken. Nicht zuletzt freut es mich, dadurch auch eine Verbindung zu meiner alten Alma Mater zu erhalten, auf das vielleicht einige alte Freunde und Wegbegleiter das Ende meiner Doktorarbeit mit mir erleben dürfen...

Apropos Freunde und Wegbegleiter... Ihr habt natürlich alle beim Gelingen dieser Arbeit in irgendeiner Weise beigetragen: Thomas „Schmiddy“ Schmid, Thilo „Burgi“ Borchardt, Marianne Granz, Katja „Zabel“ Borchardt, Katja Kolditz, Susanne Kreutzer, Marcus Krüger, André Schneider, Julia, Jia „Jason“ Shen, Ole, Frau Kirchner, Nicole, Schmolle, Jens-Uwe, Daniela, Katja Schmid, die Beutler-Crew (Heike, Heiko, Vilma, Bernde, Linda, Jonas), Daniel, Basti, Denis...

Natürlich gilt mein größter Dank meinen Eltern und der restlichen Familie für den Rückhalt und nicht zuletzt für die finanzielle Unterstützung sowie die Möglichkeit mich frei zu entfalten... Darüber hinaus möchte ich mich auch bei Norma bedanken, die mir über all die Jahre die Treue gehalten hat, obwohl wir es nicht geschafft haben, den Weg gemeinsam bis zum Ende zu gehen...

Der großväterliche Rat: „Hadere nich mit dem Schicksal, denn Du weist nicht wofür es gut ist...“ hat mir glücklicherweise die Augen geöffnet für etwas ganz Großes und Wundervolles...

Sylvia, Ich liebe Dich...

7.3. Standardlösungen und Stammlösungen

Lösungen

Annealing-Puffer [10x]	670 mM Tris pH 7.6 130 mM MgCl ₂ 67 mM DTT 13 mM Spermidin 13 mM EDTA
CASTing Bindepuffer	100 mM NaCl 20 mM Hepes pH 7.5 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM DTT 1 mM PMSF 10 µg Pepstatin per ml 10 µg Leupeptin per ml 0,1% Triton X-100 20% Glycerol
CASTing Waschpuffer	0,85% NaCl 0,1% NP-40 0,1 mg/ml BSA
Chlorophan	Roti-Phenol/Chloroform (Roth) 0,5 g 8-Hydroxychinolin zugeben und mit 1x TE über-schichten
CPRG-Stammlösung	50 mM CPRG bei -20°C lagern
EMSA-Bindepuffer	50 mM Hepes pH 7.5 50% Glycerin 0.5 mM EDTA 250 mM KCl 20 mM Spermidin 10 mM MgCl ₂ 2.5 mM DTT
GET-Puffer:	50 mM Glukose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl pH 8.0
Hochsalzlösung:	3 M Kalziumacetat
HBS-Puffer	16 g NaCl 0,74 g KCl 0,25 g Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O) 10 g Hepes auf 2 l H ₂ O auffüllen (pH 7.05)
Hybridisierungspuffer	50% Formamid 5x SSC pH 4.5 50 µg/ml t-RNA 1% SDS 50 µg/ml Heparin
IPTG	100 mM IPTG in Aqua bidest Lagerung bei -20°C
Lysis-Puffer:	0,2 M NaOH 1% SDS
Lösung 1	50% Formamid 5x SSC 1% SDS pH 4.5

Lösung 2	0,5 M NaCl 10 mM TrisHCl pH 4.7 0,1% Tween-20
Lösung 3	50% Formamid 2x SSC pH 4.5
Lysis-Puffer:	0,2 M NaOH 1% SDS
NTMT	10 ml 5 M NaCl 50 ml 1 M Tris-HCl pH 9.5 25 ml 1 M MgCl ₂ 500 µl Tween20 1 ml Levamisol ad 500 ml Aqua bidest
NP40-Lysispuffer	150 mM NaCl 1% IGEPAL CA-630 50 mM TrisHCL pH 8.0 Proteinase-Hemmer-Mix (Promega)
Paraformaldehyd [4%]	4% Paraformaldehyd in 1x PBS auf 65°C erhitzen um die Löslichkeit zu erhöhen, einige Tropfen NaOH zugeben pH-Wert-Einstellung mit HCl auf 7.0 Lagerung bei -20°C
PBS [10x]	40 g NaCl 1 g KCl 7,2 g Na ₂ HPO ₄ (2 H ₂ O) 1 g KH ₂ PO ₄ ad 500 ml Aqua bidest; autoklavieren
PBT	PBS 0,1% Tween20
Prähybridisierungspuffer	50% Formamid 5x SSC pH 4.5 50 µg/ml t-RNA 1% SDS 50 µg/ml Heparin
Ribonukleotid-Mix	10 mM GTP 10 mM ATP 10 mM CTP; 6,5 mM UTP 3,5 mM Digoxigenin-UTP
Rnase Lösung (Dnase-frei)	10 mg/ml 10 mM TrisHCl pH 7.5 15 mM NaCl
SDS-Laufpuffer [10x]	30,2 g Tris-Base 144 g Glycin 10 g SDS ad 1l Aqua bidest
Solubilisierungs-Puffer	250 mM NaCl 0,25% NP-40 10 mM Tris 5 mM EDTA pH 7.5
SSC [20x]	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat pH 7.0

TENS-Puffer	50 mM Tris HCl pH 8.0 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1% SDS
TAE [50x]	242 g Tris-Base 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA ad 1l Aqua bidest pH 8.0
TBS [10x]	250 mM Tris/ HCl 1.5 M NaCl pH 7.5
TBST [10x]	8 g NaCl 0,2 g KCl 25 ml 1 M Tris pH 7.5 10 ml Tween20 ad 100 ml Aqua bidest
TBST / Levamisol	TBST 2 mM Levamisol
TE [10x]	100 ml Tris/HCl pH 7.5 20 ml 0,5 M EDTA ad 1L Aqua bidest
Transkriptionspuffer	400 mM Tris/HCl pH 8.25 60 mM MgCl ₂ 20 mM Spermidin
X-Gal [2%]	0,02 g in 1 ml Dimethylformamid bei -20 °C lagern
Z-Puffer	0.06 M Na ₂ HPO ₄ 0.04 M NaH ₂ PO ₄ 0.01 M KCl 1 mM β-Mercaptoethanol

Medien

LB-Medium	1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Hefeextrakt 1% NaCl pH 7.5; autoklavieren
LB-Agar	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar auf 1 l H ₂ O pH 7.2; autoklavieren
Lösung B	36% Glycerin 12% PEG 8,000 12 mM MgSO ₄ in LB-Medium, Ansatz steril filtrieren
Medium A	10 mM MgSO ₄ 0,2% Glucose in LB-Medium, Ansatz steril filtrieren

Zellkultur Medien

Einfriermedium	DMEM (Dulbecco's Mod Eagle Medium) 20% FKS 12% DMSO steril filtrieren
ES-Zellmedium	DMEM (Dulbecco's Mod Eagle Medium) 4 mg/ml Glukose 2 mM Glutamin 0.1 mM nicht essentielle Aminosäuren 1 mM Natriumpyruvat 0.1 mM β -Mercaptoethanol 20% FKS 50 μ g/ml Penicillin/Streptomycin 1000 U/ml Leukämie-Inhibitionsfaktor
Kulturmedium	DMEM (Dulbecco's Mod Eagle Medium) 10% FKS (20% FKS) 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin 20 mM Glutamin
Trypsin/EDTA [10x]	0,5%/0,2% (w/v) in 10x PBS

7.4. Glossar

A	Adenin
Aliquot	Teilmenge
Amp	Ampicilin; ein Antibiotikum
antisense	<i>eng</i> : in entgegengesetzter Orientierung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaare (<i>eng</i> : base pairs)
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CAP	<i>eng</i> : Kappe; Guaninrest am 5'-Ende der mRNA
Ci	Curie
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (<i>eng</i> : counts per minute)
CPRG	Chlorphenolrot-b-D-Galaktopyranosid
d	Tag(e)
Da	Dalton; Gewichtseinheit für Proteine
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Mod Eagle Medium; ein Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS / DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxycytosintriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure; Chelator von zweiwertigen Kationen
EMSA	<i>eng</i> : <u>e</u> lectrophoretic <u>m</u> obility <u>s</u> hift <u>a</u> ssay; Gel-Retensions-Analyse
EtOH	Ethanol
FKS	foetales Kälberserum
G	Guanin
GFP	<i>eng</i> : <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein; ein Protein das im UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt wird
h	Stunde
HEK	<i>eng</i> : <u>h</u> uman <u>e</u> mbrional <u>k</u> idney; humane Zelllinie
HS-DNA	Herings sperma-DNA
IPTG	Isopropyl-1-thio-b-D-galactosid; Induktor am <i>lac</i> -Operon
kb	Kilobasen; 1000 Basenpaare
kDa	Kilodalton; 1000 Dalton
Kit	Box mit allen Komponenten für eine bsetimmte Reaktion
l	Liter
LB	Luria Broth; Medium für Bakterien
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
min..	Minute(n)
MKS	Multiple Klonierungsstelle
mRNA	<i>eng</i> : <u>m</u> essenger RNA; bei der Transkription gebildete Boten-DNA
MT	Myc-Tag; 6-fache Wiederholung des Myc-Epitops
mV	Millivolt
NBT	<u>N</u> itro <u>b</u> l <u>a</u> u <u>t</u> etrazolium
NP-40	Nondiet P-40; ein Detergenz
OD	optische Dichte; oft im Zusammenhang mit einer Zahl, welche die Wellenlänge bezeichnet
ORF	<i>eng</i> : <u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame; offenes Leseraster
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> cryl <u>a</u> mid <u>g</u> e <u>l</u> e <u>l</u> ektrophorese
PCR	<i>eng</i> : <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction; Polymerasekettenreaktion
PEG	<u>P</u> oly <u>e</u> thylenglykol
pH	Potential Hydrogenii (-log[H ₃ O ⁺])
PMSF	<u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonylfluorid
Primer	Oligonukleotid das zum Start der DNA-Synthese benötigt wird
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	<i>eng</i> : <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur; 20°C
sek.	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>eng</i> : <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate); ein Detergenz
SID	<i>eng</i> : <u>s</u> calloped <u>i</u> nteraction <u>d</u> omain
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	DNA Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Broat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Puffersubstanz
tRNA	Transfer-DNA; wird bei der Translation benötigt
U	Uracil
ü.N.	über Nacht
U/min.	Umdrehungen pro Minute
unit	Einheit; Mengenangabe für Enzyme
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-b-D-galactosid; Substrat der b-Galaktosidase

7.5. Veröffentlichungen und Poster

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung von Prof. Braun vorab in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Mielcarek M., Günther S., Krüger M. and Braun T. (2002). VITO-1, a novel vestigial related protein is predominantly expressed in the skeletal muscle lineage., *Mech Dev.* 119, 269-274

Günther S., Mielcarek M., Krüger M. and Braun T. (2004). VITO-1 is an essential cofactor of TEF1-dependent muscle-specific gene regulation., *Nucl. Acid Res.* 32, 791-802

Mielcarek M., Schneider A., Günther S. and Braun T. (2008). VITO-2, a new SID-domain protein, is primarily expressed in the myogenic lineage during mouse embryonic development., *in press*.

Günther S., Mielcarek M. and Braun T. (2008). A distinct role of VITO proteins during myogenesis by interference of TEF-1 dependent gene regulation., *in press*

Poster:

The function of transcriptional co-regulators for MCAT-dependent muscle-specific gene activity during development and disease. *2nd Myores Annual Congress*, Prag, 29. September - 03. Oktober 2006.

The VITO gene family is an essential cofactor of TEF-dependent muscle-specific gene regulation. *3rd Myores Annual Congress*, Venedig, 17. - 20. Dezember 2007.

Screening of a LOPAC library for small molecules that enhance differentiation of C₂C₁₂ myoblasts. *“Remodeling and Reverse Remodeling in the Cardio-Pulmonary System“*, *Leopoldina-Symposium*, Bad Nauheim, 29. Juni - 02. Juli 2008.

8. Literatur

- Adra C.N., Boer P.H., McBurney M.W. (1987). Cloning and expression of the mouse pgk-1 gene and the nucleotide sequence of its promoter. *Gene*. 60(1): 65-74.
- Ai Z., Misra S., Susa M., Varticovski L., Cohen C.M. (1995). Phosphatidylinositol 3-kinase activity in murine erythroleukemia cells during DMSO-induced differentiation. *Exp Cell Res*. 219(2): 454-60.
- Aizenman Y., de Vellis J. (1987). Synergistic action of thyroid hormone, insulin and hydrocortisone on astrocyte differentiation. *Brain Res*. 414(2): 301-8.
- Alaimo P.J., Shogren-Knaak M.A., Shokat K.M. (2001). Chemical genetic approaches for the elucidation of signaling pathways. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 5: 360–367.
- Amthor H., Christ B., Patel K. (1999). A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development*. 126(5): 1041-53.
- Andrianopoulos A., Timberlake W.E. (1991). ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell* 3: 747-8.
- Andrianopoulos A., Timberlake W.E. (1994). The *Aspergillus nidulans* *abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol. Cell. Biol*. 14: 2503-15.
- Apone S., Hauschka S.D. (1995). Muscle gene E-box control elements. Evidence for quantitatively different transcriptional activities and the binding of distinct regulatory factors. *J Biol Chem*. 270(36): 21420-7.
- Appell H.J., Forsberg S., Hollmann W. (1988). Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neof ormation. *Int J Sports Med*. 9(4): 297-9.
- Arany Z., Sellers W.R., Livingston D.M., Eckner R. (1994). E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators [letter]. *Cell (Cambridge Mass.)* 77: 799-800.
- Asakura A., Seale P., Girgis-Gabardo A., Rudnicki M.A. (2002). Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol*. 159(1): 123-34.
- Azaki A., Larkin S.B., Farrance I.K., Grenningloh G., Ordahl C.P. (1996). DTEF-1, a novel member of the transcription enhancer factor-1 (TEF-1) multigene family. *J. Biol. Chem*. 271: 8260-65.
- Ball E.H., Sanwal B.D. (1980). A synergistic effect of glucocorticoids and insulin on the differentiation of myoblasts. *J Cell Physiol*. 102(1): 27-36.
- Baskin R.J., Deamer D.W. (1970). A membrane-bound creatine phosphokinase in fragmented sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 245(6): 1345-7.
- Batts T.W. (2002) Effects of Reduced Muscle Glycogen on Sarcoplasmic Reticulum (SR), Muscle and Exercise Performance (PhD thesis). Blacksburg, VA: Virginia Polytechnic Institute and State University, 2002.
- Beauchamp J.R., Heslop L., Yu D.S., Tajbakhsh S., Kelly R.G., Wernig A., Buckingham M.E., Partridge T.A., Zammit P.S. (2000). Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol*. 151(6): 1221-34.
- Berberich C., Durr I., Koenen M., Witzemann V. (1993). Two adjacent E box elements and a M-CAT box are involved in the muscle-specific regulation of the rat acetylcholine receptor beta subunit gene. *Eur. J. Biochem*. 216: 395-404.
- Betteridge D.J. (1993). Ciprofibrate--a profile. *Postgrad Med J*. 69 Suppl 1:S42-7; discussion S47-9. Review.
- Black B.L., Olson E.N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 14: 167-96. Review.
- Bladt F., Riethmacher D., Isenmann S., Aguzzi A., Birchmeier C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*. 376(6543): 768-71.
- Blatt C., DePamphilis M.L. (1993). Striking homology between mouse and human transcription enhancer factor-1 (TEF-1). *Nucleic Acids Res*. 21: 747-8.
- Bober E., Franz T., Arnold H.H., Gruss P., Tremblay P. (1994). Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development*. 120(3): 603-12.
- Bober E., Lyons G.E., Braun T., Cossu G., Buckingham M., Arnold H.H. (1991). The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J Cell Biol*. 113(6): 1255-65.

- Borycki A.G., Brunk B., Tajbakhsh S., Buckingham M., Chiang C., Emerson C.P. Jr. (1999). Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation. *Development*. 126(18): 4053-63.
- Brandenberger R., Wei H., Zhang S., Lei S., Murage J., Fisk G.J., Li Y., Xu C., Fang R., Guegler K., Rao M.S., Mandalam R., Lebkowski J., Stanton L.W. (2004). Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nat Biotechnol*. 22(6): 707-16.
- 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*. 14(6): 1176-86.
- Braun T., Arnold H.H. (1996). Myf-5 and myoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages. *EMBO J*. 15(2): 310-18.
- 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): 3083-92.
- Braun T., Rudnicki M.A., Arnold H.H., Jaenisch R. (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 71: 369-382.
- Braun T., Winter B., Bober E., Arnold H.H. (1990). Transcriptional activation domain of the muscle-specific gene-regulatory protein myf5. *Nature*. 346(6285): 663-5.
- Bronfman M., Ponce C., Rojas S., Roth A., Loyola G., Vollrath V., Chianale J. (1998). Enhanced differentiation of HL-60 leukemia cells to macrophages induced by ciprofibrate. *Eur J Cell Biol*. 77(3): 214-9.
- Buchholz F., Refaeli Y., Trumpp A., Bishop J.M. (2000). Inducible chromosomal translocation of AML1 and ETO genes through Cre/loxP-mediated recombination in the mouse. *EMBO Rep*. 1(2): 133-139.
- Buckingham M. (2006). Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*. 16(5):525-32. Review.
- Buckingham M. (2007). Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *C R Biol*. 330(6-7): 530-3.
- Buckingham M., Bajard L., Chang T., Daubas P., Hadchouel J., Meilhac S., Montarras D., Rocancourt D., Relaix F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat*. 202(1): 59-68. Review.
- Buckingham M., Relaix F. (2007). The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23: 645-73. Review.
- Buffinger N., Stockdale F.E. (1994). Myogenic specification in somites: induction by axial structures. *Development*. 120(6): 1443-52.
- Bürglin T.R. (1991). The TEA domain: A novel, highly conserved DNA-binding motif. The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell* 66: 11-12.
- Campbell S., Inamdar M., Rodrigues V., Raghavan V., Palazzolo M., Chovnick A. (1992). The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev*. 6: 367-79.
- Carson J.A., Schwartz R.J., Booth F.W. (1996). SRF and TEF-1 control of chicken skeletal alpha-actin gene during slow-muscle hypertrophy. *Am J Physiol*. 270(6 Pt 1): C1624-33.
- Carmeliet P. (2008). Use of PPAR-alpha agonists to treat skeletal muscle wasting disorders. Patent-Nr.: WO/2008/006819
- Chalepakis, G., Goulding, M., Read, A., Strachan, T., Gruss, P. (1994). Molecular basis of splotch and Waardenburg Pax-3 mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 91: 3685-3689.
- Chambers A.E., Logan M., Kotecha S., Towers N., Sparrow D., Mohun T.J. (1994). The RSRF/MEF2 protein SL1 regulates cardiac muscle-specific transcription of a myosin light-chain gene in *Xenopus* embryos. *Genes & Dev*. 8: 1324-34.
- Charakida A., Dadzie O., Teixeira F., Charakida M., Evangelou G., Chu A.C. (2006). Calcipotriol/betamethasone dipropionate for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Pharmacother*. 7(5): 597-606. Review.
- Chaudary S., Brou C., Valentin M.E., Burton N., Tora L., Chambon P., Davidson I. (1994). A cell specific factor represses stimulation of transcription in vitro by transcriptional enhancer factor-1. *J. Biol. Chem*. 14: 5290-99.
- Chen H.H., Maeda T., Mullett S.J., Stewart A.F. (2004). Transcription cofactor Vgl-2 is required for skeletal muscle differentiation. *Genesis*. 39(4): 273-9.
- Chen Z., Friedrich G.A., Soriano P. (1994). Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice. *Genes Dev*. 8: 2293-301.
- Chi N., Epstein J.A. (2002). Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet*. 18(1): 41-7. Review.

- Chiba H., Muramatsu M., Nomoto A., Kato H. (1994). Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila brahma* are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res.* 22: 1815-20.
- Christ B., Brand-Saberi B., Grim M., Wilting J. (1992). Local signalling in dermomyotomal cell type specification. *Anat Embryol (Berl)*. 186(5): 505-10.
- Christ B., Ordahl C.P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anat.Embryol.(Berlin)* 5: 381-96.
- Cogan J.G., Sun S.Q., Stoflet E.S., Schmidt L.J., Getz M.J., Strauch A.R. (1995). Plasticity of vascular smooth muscle alpha-actin gene transcription. Characterization of multiple, single-, and double-strand specific DNA-binding proteins in myoblasts and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 270: 11310-21.
- Collins S. J., Ruscetti F. W., Gallagher R. E., Gallo R. C. (1978). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A.*75: 2458-2462.
- Conboy I.M., Conboy M.J., Wagers A.J., Girma E.R., Weissman I.L., Rando, T.A. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433: 760-764.
- Conboy I.M., Rando T.A. (2002). The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell.* 3(3): 397-409.
- Cooper J.A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol.* 105(4): 1473-8. Review.
- Cooper T.A., Ordahl C.P. (1984). A single troponin T gene regulated by different programs in cardiac and skeletal muscle development. *Science* 226: 979-82.
- Cooper T.A., Ordahl C.P. (1985). A single cardiac troponin T gene generates embryonic and adult isoforms via developmentally regulated alternate splicing. *J. Biol. Chem.* 260: 11140-8.
- 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.
- Cornelison D.D., Olwin B.B., Rudnicki M.A., Wold B.J. (2000). MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol.* 224(2): 122-37.
- Daston G., Lamar E., Olivier M., Goulding M. (1996). Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Development.* 122(3): 1017-27.
- Davidson I., Xiao J.H., Rosales R., Staub A., Chambon P. (1988). The HeLa cell protein TEF-1 binds specifically and cooperatively to two SV40 enhancer motifs of unrelated sequence. *Cell* 54: 931-42.
- Dayhoff M.O., Schwartz R.M., Orcutt B.C. (1978). A model of evolutionary change in proteins, matrixes for detecting distant relationships. *Atlas of protein sequence an structure (Washington)*. Vol.5: 345-58.
- Dekhujzen P.N., Gayan-Ramirez G., Bisschop A., De Bock V., Dom R., Decramer M. (1995). Corticosteroid treatment and nutritional deprivation cause a different pattern of atrophy in rat diaphragm. *J Appl Physiol.* 78(2): 629-37.
- Delaquis P., Stanich K., Toivonen P. (2005). Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. *J Food Prot.* 68(7): 1472-6.
- Delfini M., Hirsinger E., Pourquie O., Duprez D. (2000). Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis. *Development* 127: 5213-5224.
- Denetclaw W.F., Christ B., Ordahl C.P. (1997). Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Development* 124: 1601-10.
- Deshpande N., Chopra A., Rangarajan A., Shashidhara L.S., Rodrigues V., Krishna S. (1997). The human transcription factor, TEF-1, can substitute for *Drosophila scalloped* during wingblade development. *J. Biol. Chem.* 272: 10664-8.
- Dietrich S., Abou-Rebyeh F., Brohmann H., Blatt F., Sonnenberg-Riethmacher E., Yamaai T., Lumsden A., Brand-Saberi B., Birchmeier C. (1999). The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development.* 126(8): 1621-9.
- Dorman B.H., Cavallo M.J., Hinton R.B., Roy R.C., Spinale F.G. (1996). Preservation of myocyte contractile function after hypothermic, hyperkalemic cardioplegic arrest with 2, 3-butanedione monoxime. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 111(3): 621-9.
- Dow J., Stracher A. (1971) Changes in the properties of myosin associated with muscle development. *Biochemistry* 10(8): 1316-21.

- Duprez D., Fournier-Thibault C., Le Douarin N. (1998). Sonic Hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. *Development*. 125(3): 495-505.
- Eilam Y. and Othman M. (1990). Activation of Ca²⁺ influx by metabolic substrates in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of membrane potential and cellular ATP levels. *J. Gen. Microbiol.* 136: 861–866.
- Eilam Y., Othman M., Halachmi D. (1990). Transient increase in Ca²⁺ influx in *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose: Effects of intracellular acidification and cAMP levels *J. Gen. Microbiol.* 136: 2537–2543.
- Eisfeld J., Mikala G., Varadi G., Schwartz A., Klöckner U. (1997). Inhibition of cloned human L-type cardiac calcium channels by 2,3-butanedione monoxime does not require PKA-dependent phosphorylation sites. *Biochem Biophys Res Commun.* 230(3): 489-92.
- Epstein J., Cai J., Glaser T., Jepeal L., Maas R. (1994). Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. *J Biol Chem.* 269(11): 8355-61.
- Fan C.M., Tessier-Lavigne M. (1994). Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell.* 79(7): 1175-86.
- Farrance I.K.G., Mar J., Ordahl C.P. (1992). M-CAT binding factor is related to the SV40 enhancer binding factor, TEF-1. *J. Biol. Chem.* 267: 17234-40.
- Farrance I.K.G., Ordahl C.P. (1996) The role of transcription enhancer factor-1 (TEF-1) related proteins in the formation of M-CAT binding complexes in muscle and non-muscle tissues. *J. Biol. Chem.* 271: 8266-74.
- Faulker W.R., Meites S. (1982). Selected Method of Clinical Chemistry 9: 185.
- Feller J., Schneider A., Schuster-Gossler K., Gossler A. (2008). Cyclic Notch activity in the Presomitic Mesoderm is dispensable for segmentation in mice. *in press*
- Feng Y., Carroll A.R., Addepalli R., Fechner G.A., Avery V.M., Quinn R.J. (2007). Vanillic acid derivatives from the green algae *Cladophora socialis* as potent protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. *J Nat Prod.* 70(11): 1790-2.
- Fitzpatrick D., Purves D., Augustine G. (2004). "Table 20:2", *Neuroscience, Third Edition, Sunderland, Mass: Sinauer.* ISBN 0-87893-725-0.
- Flanagan-Steet H., Hannon K., McAvoy M.J., Hullinger R., Olwin B.B. (2000). Loss of FGF receptor 1 signaling reduces skeletal muscle mass and disrupts myofiber organization in the developing limb. *Dev Biol.* 218(1): 21-37.
- Flink I.L., Edwards J.G., Bahl J.J., Liew C.C., Sole M., Morkin E. (1992). Characterization of a strong positive cis-acting element of the human beta-myosin heavy chain gene in fetal rat heart cells. *J. Biol. Chem.* 267: 9917-24.
- Garriga J., Adanero E., Fernández-Solá J., Urbano-Márquez A., Cussó R. (2000). Ethanol inhibits skeletal muscle cell proliferation and delays its differentiation in cell culture. *Alcohol Alcohol.* 35(3): 236-41.
- Garry D.J., Meeson A., Elterman J., Zhao Y., Yang P., Bassel-Duby R., Williams R.S. (2000). Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(10): 5416-21.
- Gilbert S.F. (1997). *Developmental biology. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.*
- Gosselink R., Troosters T., Decramer M. (1996). Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 153(3): 976-80.
- Gould S.J., Subramani S. (1988). Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal Biochem.* 15: 175-13.
- Goulding M., Lumsden A., Paquette A.J. (1994). Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development.* 120(4): 957-71.
- Grégoire F., Genart C., Hauser N., Remacle C. (1991). Glucocorticoids induce a drastic inhibition of proliferation and stimulate differentiation of adult rat fat cell precursors. *Exp Cell Res.* 196(2): 270-8.
- Griffin P.P., Schubert-Zsilavecz M., Stark H. (2004). Hemmstoffe von Beta-Adrenozeptoren: Gemeinsamkeiten und Unterschiede. *Pharmazie in unserer Zeit.* 33(6): 442-9.
- Gruss P., Walther C. Pax in development. *Cell.* 69(5): 719-22. Review.
- Guarente L. (1995). Transcriptional coactivators in yeast and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 20:, 517-21.
- Gupta M., Kogut P., Davis F.J., Belaguli N.S., Schwartz R.J., Gupta M.P. (2001). Physical interaction between the MADS box of serum response factor and the TEA/ATTS-binding domain of transcription enhancer factor-1. *J. Biol. Chem.* 276: 10413-22.

- Gupta M.P., Gupta M., Zak R. (1994). An E-box/M-CAT hybrid motif and cognate binding protein(s) regulate the basal muscle-specific and cAMP-inducible expression of the rat cardiac alpha-myosin heavy chain gene. *J. Biol. Chem.* 269: 29677-87.
- Habazettl H., Voigtländer J., Leiderer R., Messmer K. (1998). Efficacy of myocardial initial reperfusion with 2,3 butanedione monoxime after cardioplegic arrest is time-dependent. *Cardiovasc Res.* 37(3): 684-90.
- Halder G., Carroll S.B. (2001). Binding of the Vestigial cofactor switches the DNA-target selectivity of the Scalloped selector protein. *Dev.* 128: 3295-305.
- Hamilton A.L., Killian K.J., Summers E., Jones N.L. (1995). Muscle strength, symptom intensity, and exercise capacity in patients with cardiorespiratory disorders. *Am J Respir Crit Care Med.* 152(6 Pt 1): 2021-31.
- Han H., Tanigaki K., Yamamoto N., Kuroda K., Yoshimoto M., Nakahata T., Ikuta K., Honjo T. (2002). Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol.* 14(6): 637-45.
- Hasty P., Bradley A., Morris J.H., Edmondson D.G., Venuti J.M., Olson E.N., Klein W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature.* 364(6437): 501-6.
- Higuchi H., Takemori S. (1989). Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. *J Biochem.* 105(4): 638-43.
- Hinterberger T.J., Sassoon D.A., Rhodes S.J., Konieczny S.F. (1991). Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development. *Dev Biol.* 147(1): 144-56.
- Hirobe T. (1996). Hydrocortisone is involved in regulating the proliferation and differentiation of mouse epidermal melanoblasts in serum-free culture in the presence of keratinocytes. *Eur J Cell Biol.* 71(4): 387-94.
- Hong J.T., Yun Y.P. (1998). Effects of the peroxisome proliferator ciprofibrate and prostaglandin F2 alpha combination treatment on second messengers in cultured rat hepatocytes. *Arch Pharm Res.* 21(2): 120-7.
- Horst D., Ustanina S., Sergi C., Mikuz G., Juergens H., Braun T., Vorobyov E. (2006). Comparativ expression analysis of Pax3 and Pax7 during mouse myogenesis. *Int J Dev Biol.* 50(1): 47-54.
- Horvitz H.R., Herskowitz I. (1992). Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* 68: 237-255.
- Hozumi K., Negishi N., Suzuki D., Abe N., Sotomaru Y., Tamaoki N., Mailhos C., Ish-Horowicz D., Habu S., Owen M.J. (2004). Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol.* 5(6): 638-44.
- Hrabě de Angelis M., McIntyre J. 2nd, Gossler A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature.* 386(6626): 717-21.
- Hsu D.K.W., Guo Y., Alberts G.F., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Peifley K.A., Winkles J.A. (1996). Identification of a murine TEF-1-related gene expressed after mitogenic stimulation of quiescent fibroblasts and during myogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* 271: 13786-95.
- Hwang J.J., Chambon P., Davidson I. (1993). Characterization of the transcription activation function and the DNA binding domain of transcriptional enhancer factor-1. *EMBO J.* 12: 2337-48.
- Iannello R., Mar J.H., Ordahl C.P. (1991). Characterization of a promoter element required for transcription in myocardial cells. *J. Biol. Chem.* 266: 3309-16.
- Ibelgautz H. (1993). Gentechnologie von A bis Z. *VCH Verlagsgesellschaft.*
- Inamdar M., Vijayraghavan K., Rodrigues V. (1993). The Drosophila homolog of the human transcription factor TEF-1, scalloped, is essential for normal taste behavior. *J. Neurogenet.* 9: 123-39.
- Ireland DC, Bord S, Beavan SR, Compston JE. (2004). Hydrocortisone increases the rate of differentiation of cultured human osteoblasts. *J Cell Biochem.* 91(3): 594-601.
- Ishiji T., Lacey M.J., Parkkinen S., Anderson R.D., Haugen T.H., Cripe T.P., Xiao J.H., Davidson I., Chambon P., Turek L.P. (1992) Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J.* 11: 2271-81.
- Itoh N., Mima T., Mikawa T. (1996). Loss of fibroblast growth factor receptors is necessary for terminal differentiation of embryonic limb muscle. *Development.* 122(1): 291-300.
- Jänne J., Alhonen L., Pietilä M., Keinänen T.A. (2004). Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur J Biochem.* 271(5): 877-94. Review.

- Jacquemin P., Oury C., Belayew A., Martial J.A. (1994). A TEF-1 binding motif that interacts with placental protein is important for the transcriptional activity of the hCS-B enhancer. *DNA Cell Biol.* 13: 1037-45.
- Jacquemin P., Hwang J.J., Martial J.A., Dollé P., Davidson I. (1996) A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* 271: 21775-85.
- Jayawant A.M., Stephenson E.R. Jr., Damiano R.J. Jr. (1999). 2,3-Butanedione monoxime cardioplegia: advantages over hyperkalemia in blood-perfused isolated hearts. *Ann Thorac Surg.* 67(3): 618-23.
- Ji S.J., Zhuang B., Falco C., Schneider A., Schuster-Gossler K., Gossler A., Sockanathan S. (2006). Mesodermal and neuronal retinoids regulate the induction and maintenance of limb innervating spinal motor neurons. *Dev Biol.* 297(1): 249-61.
- Jiang S.W., Eberhardt N.L. (1995). Involvement of a protein distinct from transcription enhancer factor-1 (TEF-1) in mediating human chorionic somatomammotropin gene enhancer function through the GT-IIC enhansion in choriocarcinoma and COS cells. *J. Biol. Chem.* 270: 13906-15.
- Johnson C.S., Blanton M.R., Hunter E.S. 3rd. (2004) Effects of ethanol and hydrogen peroxide on mouse limb bud mesenchyme differentiation and cell death. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 40(3-4): 108-12.
- Jordan A., Hadfield J.A., Lawrence N.J., McGown A.T. (1998). Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev.* 18(4): 259-96. Review.
- Jostes B., Walther C., Gruss P. (1990). The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech Dev.* 33(1): 27-37.
- Kablar B., Asakura A., Krastel K., Ying C., May L.L., Goldhamer D.J., Rudnicki M.A. (1998). MyoD and Myf-5 define the specification of musculature of distinct embryonic origin. *Biochem Cell Biol.* 76(6): 1079-91.
- Kakimoto T. (1998). Cytokinin signaling. *Curr Opin Plant Biol.* 1(5): 399-403. Review.
- Kariya K., Karns L.R., Simpson P.C. (1994). An enhancer core element mediates stimulation of the rat beta-myosin heavy chain promoter by an alpha 1-adrenergic agonist and activated beta-protein kinase C in hypertrophy of cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 3775-82.
- Karns L.R., Kariya K., Simpson P.C. (1995). M-CAT, CARG, and Sp1 elements are required for alpha 1-adrenergic induction of the skeletal alpha-actin promoter during cardiac myocyte hypertrophy. Transcriptional enhancer factor-1 and protein kinase C as conserved transducers of the fetal program in cardiac growth. *J. Biol. Chem.* 270: 410-17.
- Kassar-Duchossoy L., Giacone E., Gayraud-Morel B., Jory A., Gomès D., Tajbakhsh S. (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* 19(12): 1426-31.
- 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.* 102(1): 17-9.
- Keller C., Hansen M.S., Coffin C.M., Capecchi M.R. (2004). Pax3:Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin. *Genes Dev.* 18(21): 2608-13.
- Koerts-de Lang E., Hesselink M.K., Drost M.R., van der Vusse G.J., Wouters E.F., Schols A.M. (1999). Enzyme activity of rat tibialis anterior muscle differs between treatment with triamcinolone and prednisolone and nutritional deprivation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 79(3): 274-9.
- Koerts-de Lang E., Schols A.M., Rooyackers O.E., Gayan-Ramirez G., Decramer M., Wouters E.F. (2000). Different effects of corticosteroid-induced muscle wasting compared with undernutrition on rat diaphragm energy metabolism. *Eur J Appl Physiol.* 82(5-6): 493-8.
- Koerts-De Lang E., Schols A.M., Wouters E.F., Gayan-Ramirez G., Decramer M. (1998). Contractile properties and histochemical characteristics of the rat diaphragm after prolonged triamcinolone treatment and nutritional deprivation. *J Muscle Res Cell Motil.* 19(5): 549-55.
- Kovács I., Toldy E., Abel T., Tarján J., Császár A. (2005). The effect of ciprofibrate on flow-mediated dilation and inflammatory markers in patients with combined hyperlipidemia. *Endothelium.* 12(4): 179-83.
- Krüger M., Mennerich D., Fees S., Schäfer R., Mundlos S., Braun T. (2001). Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. *Development.* 128(5): 743-52.
- Kuang S., Chargé S.B., Seale P., Huh M., Rudnicki M.A. (2006). Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol.* 172(1): 103-13.
- Kuang S., Kuroda K., Le Grand F., Rudnicki M.A. (2007). Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell.* 129(5): 999-1010.

- Kuroda K., Han H., Tani S., Tanigaki K., Tun T., Furukawa T., Taniguchi Y., Kurooka H., Hamada Y., Toyokuni S., Honjo T. (2003). Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity*. 18(2): 301-12.
- LaBarge M.A., Blau H.M. (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111: 589–601.
- Larkin S.B., Ordahl C.P. (1999). Multiple layers of control in transcriptional regulation by MCAT elements and the TEF-1 protein family. *Heart Development, Academic Press*.
- Lassar A.B., Davis R.L., Wright W.E., Kadesch T., Murre C., Voronova A., Baltimore D., Weintraub H. (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell*. 66(2): 305-15.
- Lees S.J., Williams J.H. (2003). Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum glycogen status influences Ca²⁺ uptake supported by endogenously synthesized ATP. *Am J Physiol Cell Physiol*. 286(1): C97-104.
- Lilly B., Galewsky S., Firulli A.B., Schulz R.A., Olson E.N. (1994). D-MEF2: a MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(12): 5662-6.
- Luo Y., Roeder R.G. (1995). Cloning, functional characterization, and mechanism of action of the B-cell specific transcriptional coactivator OCA-B. *Mol. Cell. Biol*. 15: 4115-24.
- MacLellan W.R., Lee T.C., Schwarz R.J., Schneider M.D. (1994). Transforming growth factor-beta response elements of the skeletal alpha-actin gene. Combinatorial action of serum response factor, YY1, and the SV40 enhancer-binding protein, TEF-1. *J. Biol. Chem*. 269: 16754-60.
- Maeda T., Chapman D.L., Stewart A.F. (2002). Mammalian vestigial-like 2, a cofactor of TEF-1 and MEF2 transcription factors that promotes skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem*. 277(50): 48889-98.
- Mankoo B.S., Collins N.S., Ashby P., Grigorieva E., Pevny L.H., Candia A., Wright C.V., Rigby P.W., Pachnis V. (1999). Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development. *Nature*. 400(6739): 69-73.
- Mannervik M., Nibu Y., Zhang H., Levine M. (1999). Transcriptional coregulators in development. *Science*. 284(5414): 606-9. Review.
- Mansouri A., Goudreau G., Gruss P. (1999). Pax genes and their role in organogenesis. *Cancer Res*. 59(7 Suppl): 1707s-1709s; discussion 1709s-1710s. Review.
- Mansouri A., Gruss P. (1998). Pax3 and Pax7 are expressed in commissural neurons and restrict ventral neuronal identity in the spinal cord. *Mech Dev*. 78(1-2): 171-8.
- Mansouri A., Hallonet M., Gruss P. (1996a). Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Curr Opin Cell Biol*. 8(6): 851-7. Review.
- Mansouri A., Stoykova A., Gruss P. (1994). Pax genes in development. *J Cell Sci Suppl*. 18: 35-42. Review.
- Mansouri A., Stoykova A., Torres M., Gruss P. (1996b). Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7-/- mutant mice. *Development*. 122(3): 831-8.
- Mar J.H., Ordahl C.P. (1988). A conserved CATTCT motif is required for skeletal muscle-specific activity of the cardiac troponin T gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 6404-8.
- Mar J.H., Ordahl C.P. (1990). M-CAT binding factor, a novel trans-acting factor governing muscle-specific transcription. *Mol. Cell. Biol*. 10: 4271-83.
- Marcelle C., Stark M.R., Bronner-Fraser M. (1997). Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. *Development*. 124(20): 3955-63.
- Martell R.E., Simpson R.U., Hsu T. (1988). Effects of protein kinase inhibitors 1(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride (H-7) and N-[2-guanidinoethyl]-5-isoquinolinesulfonamide hydrochloride (HA1004) on calcitriol-induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem Pharmacol*. 37(4): 635-40.
- McBurney M.W. (1993). P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol*. 37(1): 135-40.
- McBurney M.W., Rogers B.J. (1982). Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol*. 89(2): 503-8.
- McKenna N.J., O'Malley B.W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*. 108(4): 465-74. Review.
- Megeney L.A., Kablar B., Garrett K., Anderson J.E., Rudnicki M.A. (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev*. 10(10): 1173-83.

- Megeney L.A., Rudnicki M.A. (1995). Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol.* 73(9-10):723-32. Review.
- Meier C.A. (1996). Co-activators and co-repressors: Mediators of gene activation by nuclear hormone receptors. *Eur. J. Endocrinol.* 134: 158-9.
- Mélin F., Miranda M., Montreau N., DePamphilis M.L., Blangy D. (1993). Transcription enhancer factor-1 (TEF-1) DNA binding sites can specifically enhance gene expression at the beginning of mouse development. *EMBO J.* 12(12): 4657-66.
- Mennerich D., Schäfer K., Braun T. (1998). Pax-3 is necessary but not sufficient for Irf1 expression in myogenic precursor cells of the limb. *Mech Dev.* 73(2): 147-58.
- Meyers E.N., Lewandoski M., Martin G.R. (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet.* 18(2):136-41.
- Mielcarek M., Günther S., Krüger M., Braun T. (2002). VITO-1, a novel vestigial related protein is predominantly expressed in the skeletal muscle lineage. *Mech Dev.* 119 Suppl 1: S269-74.
- Miñana M.D., Felipo V., Grisolia S. (1989). Inhibition of protein kinase C induces differentiation of neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 255(1): 184-6.
- Minasi M.G., Riminucci M., De Angelis L., Borello U., Berarducci B., Innocenzi A., Caprioli A., Sirabella D., Baiocchi M., De Maria R., Boratto R., Jaffredo T., Broccoli V., Bianco P., Cossu G. (2002). The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development.* 129(11): 2773-83.
- Mirabito P.M., Adams T.H., Timberlake W.E. (1989). Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* 57: 859-68.
- Molkentin J.D., Black B.L., Martin J.F., Olson E.N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell.* 83(7): 1125-36.
- Molkentin J.D., Markham B.E. (1994). An M-CAT binding factor and an RSRF-related A-rich binding factor positively regulate expression of the alpha-cardiac myosin heavy-chain gene in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5056-65.
- Montano M.M., Lim R.W. (1997). Glucocorticoid effects on the skeletal muscle differentiation program: analysis of clonal proliferation, morphological differentiation and the expression of muscle-specific and regulatory genes. *Endocr Res.* 23(1-2): 37-57.
- Moore K.A., and Lemischka I.R. (2006). Stem cells and their niches. *Science* 311: 1880–1885.
- Morgan S.J., Darling D.C. (1994). Kultur tierischer Zellen. *Spektrum Akademischer Verlag.*
- Morley P., Whitfield J.F. (1993). The differentiation inducer, dimethyl sulfoxide, transiently increases the intracellular calcium ion concentration in various cell types. *J Cell Physiol.* 156(2): 219-25.
- Muhr J., Andersson E., Persson M., Jessell T.M., Ericson J. (2001). Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell.* 104(6): 861-73.
- Münsterberg A.E., Lassar A.B. (1995). Combinatorial signals from the neural tube, floor plate and notochord induce myogenic bHLH gene expression in the somite. *Development.* 121(3): 651-60.
- Murtaugh L.C., Stanger B.Z., Kwan K.M., Melton D.A. (2003). Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(25): 14920-5.
- Nabeshima Y., Hanaoka K., Hayasaka M., Esumi E., Li S., Nonaka I., Nabeshima Y. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature.* 364(6437): 532-5.
- Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 8424-8.
- Naro F., Sette C., Vicini E., De Arcangelis V., Grange M., Conti M., Lagarde M., Molinaro M., Adamo S., Némoz G. (1999). Involvement of type 4 cAMP-phosphodiesterase in the myogenic differentiation of L6 cells. *Mol Biol Cell.* 10(12): 4355-67.
- Nel A.E., Schabort I., Rheeder A., Bouic P., Wooten M.W. (1987). Inhibition of antibodies to CD3 surface antigen and phytohemagglutinin-mediated T cellular responses by inhibiting Ca²⁺/phospholipid-dependent protein kinase activity with the aid of 1-(5-isoquinolylsulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride. *J Immunol.* 139(7): 2230-6.
- Nicolas N., Gallien C.L., Chanoine C. (1996). Analysis of MyoD, myogenin, and muscle-specific gene mRNAs in regenerating *Xenopus* skeletal muscle. *Dev Dyn.* 207: 60-68.

- Niwa H., Yamamura K., Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*. 108: 193–199.
- Noden D.M., Francis-West P. (2006). The differentiation and morphogenesis of craniofacial muscles. *Dev. Dyn.* 235: 1194–218.
- Norman C., Runswick M., Pollock R., Treisman R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell*. 55(6): 989-1003.
- Olson E.N. (1993). Regulation of muscle transcription by the MyoD family. The heart of the matter. *Circ. Res.* 72: 1-6.
- Ordahl C.P., Le Douarin N.M. (1992). Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* 114(2): 339-53.
- Ostap E.M. (2002). 2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor. *J Muscle Res Cell Motil.* 23(4): 305-8.
- Oswald F., Kostezka U., Astrahantseff K., Bourteele S., Dillinger K., Zechner U., Ludwig L., Wilda M., Hameister H., Knochel W., Liptay S., Schmid R.M. (2002). SHARP is a novel component of the Notch/RBP- Jk signalling pathway. *Embo J.* 21: 5417–5426.
- Oswald F., Winkler M., Cao Y., Astrahantseff K., Bourteele S., Knochel W., Borggreffe T. (2005). RBP-Jk/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. *Mol Cell Biol.* 25: 10379–10390.
- Ott M.O., Bober E., Lyons G., Arnold H.H., Buckingham M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* 111: 1097-1107.
- Oustanina S., Hause G., Braun T. (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J.* 23(16): 3430-9.
- Parodi M.T., Varesio L., Tonini G.P. (1990). The specific inhibitor of protein kinase C, 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H7), induces morphological change and cell differentiation of human neural crest-derived cell lineages. *FEBS Lett.* 269(1): 4-6.
- 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(10): 3347-58.
- Patocka J., Strunecká A. (1999). The most important microtubule natural inhibitors. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 42(1): 3-8. Review.
- Paumard-Rigal S., Zider A., Vaudin P., Silber J. (1998). Specific interactions between *vestigial* and *scalloped* are required to promote wing tissue proliferation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genes Evol.* 208: 440-6.
- Petrof B.J., Gottfried S.B., Eby J., Lamanca J., Levine S. (1995). Growth hormone does not prevent corticosteroid-induced changes in rat diaphragm structure and function. *J Appl Physiol.* 79(5): 1571-7.
- Poduslo S.E., Pak C.H., Miller K. (1990). Hydrocortisone induction during oligodendroglial differentiation. *Neurosci Lett.* 113(1): 84-8.
- Poleskaya A., Seale P., Rudnicki M.A. (2003). Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell.* 113(7): 841-52.
- Ponec M., Boonstra J. (1987). Effects of retinoids and hydrocortisone on keratinocyte differentiation, epidermal growth factor binding and lipid metabolism. *Dermatologica.* 175 Suppl 1: 67-72.
- Pourquié O., Fan C.M., Coltey M., Hirsinger E., Watanabe Y., Bréant C., Francis-West P., Brickell P., Tessier-Lavigne M., Le Douarin N.M. (1996). Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell.* 84(3): 461-71.
- Rang, H. P. (2003). Pharmacology. Edinburgh: Churchill Livingstone. ISBN 0-443-07145-4.
- Rassner G. (1973). Kreatin-Kinase-Mangel der Epidermis bei Psoriasis vulgaris. *Arch. Derm. Forsch* 246: 146-150.
- Relaix F., Buckingham M. (1999). From insect eye to vertebrate muscle: redeployment of a regulatory network. *Genes Dev.* 13(24): 3171-8. Review.
- Relaix F., Montarras D., Zaffran S., Gayraud-Morel B., Rocancourt D., Tajbakhsh S., Mansouri A., Cumano A., Buckingham M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol.* 172(1): 91-102.
- Relaix F., Rocancourt D., Mansouri A., Buckingham M. (2004). Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev.* 18: 1088–105.

- Relaix F., Rocancourt D., Mansouri A., Buckingham M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*. 435(7044): 948-53.
- Rhyu M.S., Jan L.Y., Jan Y.N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76: 477-491.
- 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.
- Rong P.M., Teillet M.A., Ziller C., Le Douarin N.M. (1992). The neural tube/notochord complex is necessary for vertebral but not limb and body wall striated muscle differentiation. *Development*. 115(3): 657-72.
- Rosalki S.B. (1967). An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. *J Lab Clin Med.* 69(4): 696-705.
- Rossi A.M., Eppenberger H.M., Volpe P., Cotrufo R., Wallimann T. (1990). Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca²⁺ uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *J Biol Chem.* 265(9): 5258-66.
- Rudnicki M.A., Braun T., Hinuma S., Jaenisch R. (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell*. 71(3): 383-90.
- Rudnicki M.A., Schnegelsberg P.N., Stead R.H., Braun T., Arnold H.H., Jaenisch R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*. 75(7): 1351-9.
- Sakakibara H. (2004). Cytokinin biosynthesis and regulation. *Vitam Horm.* 72: 271-87. Review.
- Salminen A., Braun T., Buchberger A., Jurs S., Winter B., Arnold H.H. (1991). Transcription of the muscle regulatory gene MYF4 is regulated by serum components, peptide growth factors and signaling pathways involving G proteins. *J. Cell Biol.* 115: 905-917.
- Sampaolesi M., Torrente Y., Innocenzi A., Tonlorenzi R., D'Antona G., Pellegrino M.A., Barresi R., Bresolin N., De Angelis M.G., Campbell K.P., Bottinelli R., Cossu G. (2003). Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. 301(5632): 487-92.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A*. 74: 5463.
- Sasaki T., Matsuoka H., Saito M. (2008). Generation of a multilayer muscle fiber sheet from mouse ES cells by the spermine action at specific timing and concentration *Stem Cell*. in press
- Sassoon D., Lyons G., Wright W.E., Lin V., Lassar A., Weintraub H., Buckingham M. (1989). Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature*. 341(6240): 303-7.
- Sauer B. (1992). Identification of cryptic lox sites in the yeast genome by selection for Cre-mediated chromosome translocations that confer multiple drug resistance. *J Mol Biol.* 223: 911-28.
- Sauer B., Henderson N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 85: 5166-5170.
- Schäfer K., Braun T. (1999). Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h. *Nat Genet.* 23(2): 213-6.
- Schmidt C., Bladt F., Goedecke S., Brinkmann V., Zschiesche W., Sharpe M., Gherardi E., Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*. 373(6516): 699-702.
- Schreiber S.L. (2003). The small-molecule approach to biology. *Chem. Eng. News* 81: 51-61.
- Schultz E., McCormick K.M. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 123: 213-57. Review.
- 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., Ishibashi J., Holterman C., Rudnicki M.A. (2004). Muscle satellite cell-specific genes identified by genetic profiling of MyoD-deficient myogenic cell. *Dev Biol.* 275(2): 287-300.
- Seale P., Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A., Mansouri A., Gruss P., Rudnicki M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 102(6): 777-86.
- Shainberg A., Yagil G., Yaffe D. (1969). Control of myogenesis in vitro by Ca²⁺ concentration in nutritional medium. *Exp Cell Res* 58: 163-167.
- Shelepov V.P., Chekulaev V.A., Pasha-Zade G.R. (1990). Effect of putrescine on carbohydrate and lipid metabolism in rats. *Biomed Sci.* 1(6): 591-6.

- Sherwood R.I., Christensen J.L., Conboy I.M., Conboy M.J., Rando T.A., I.L. Weissman I.L., Wagers A.J. (2004). Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell* 119: 543–554.
- Shih S.C., Mullen A., Abrams K., Mukhopadhyay D., Claffey K.P. (1999). Role of protein kinase C isoforms in phorbol ester-induced vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells. *J Biol Chem.* 274(22): 15407-14.
- Shimizu N., Prior G., Umeda P.K., Zak R. (1992). Cis-acting elements responsible for muscle-specific expression of the myosin heavy chain beta gene. *Nucleic Acids Res.* 20: 1793-99.
- Shimizu N., Smith G., Izumo S. (1993). Both a ubiquitous factor mTEF-1 and a distinct muscle specific factor bind to the MCAT motif of the myosin heavy chain beta gene. *Nucleic Acids Res.* 21: 4103-10.
- Shinin V., Gayraud-Morel B., Gomès D., Tajbakhsh S. (2006). Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat Cell Biol.* 8(7): 677-87.
- Simmonds A.J., Liu X., Soanes K.H., Krause H.M., Irvine K.D., Bell J.B. (1998). Molekular interactions between *vestigial* and *scalloped* promote wing formation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12: 3815-20.
- Smukste I., Stockwell B. R. (2005). Advances in chemical genetics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6: 261–286.
- Soeno Y., Shimada Y., Obinata T. (1999). BDM (2,3-butanedione monoxime), an inhibitor of myosin-actin interaction, suppresses myofibrillogenesis in skeletal muscle cells in culture. *Cell Tissue Res.* 295(2): 307-16.
- Song E.S., Lee V., Surh C.D., Lynn A., Brumm D., Jolly D.J., Warner J.F., Chada S. (1997). Antigen presentation in retroviral vector-mediated gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(5): 1943-8.
- Spence M.S., Yip J., Erickson C.A. (1996). The dorsal neural tube organizes the dermamyotome and induces axial myocytes in the avian embryo. *Development.* 122(1): 231-41.
- Spring D.R. (2005). Chemical genetics to chemical genomics: small molecules offer big insights. *Chem. Soc. Rev.* 34: 472–482.
- Sréter F.A., Bálint M., Gergely J. (1975). Structural and functional changes of myosin during development: comparison with adult fast, slow and cardiac myosin. *Dev Biol.* 46(2): 317-25.
- Stern H.M., Brown A.M., Hauschka S.D. (1995). Myogenesis in paraxial mesoderm: preferential induction by dorsal neural tube and by cells expressing Wnt-1. *Development.* 121(11): 3675-86.
- Stern H.M., Hauschka S.D. (1995). Neural tube and notochord promote in vitro myogenesis in single somite explants. *Dev Biol.* 167(1): 87-103.
- Sternberg N., Hamilton D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol.* 150(4): 467-86.
- Sternberg N., Sauer B., Hoess R., Abremski K. (1986). Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *J Mol Biol.* 187: 197-212.
- Stewart A.F., Larkin S.B., Farrance I.K., Mar J.H., Hall D.E., Ordahl C.P. (1994). Muscle-enriched TEF-1 isoforms bind MCAT elements from muscle specific promoters and differentially activate transcription. *J. Biol. Chem.* 269: 3147-50.
- Stewart A.F., Richard C.W., Suzow J., Stephan D., Weremowicz S., Morton C.C., Adra C.N. (1996). Cloning of human RTEF-1, a transcription enhancer factor-1-related gene preferentially expressed in skeletal muscle: evidence for an ancient multigene family. *Genomics* 37: 68-76.
- Strachan T., Read A.P. (1994). PAX genes. *Curr Opin Genet Dev.* 4(3): 427-38. Review.
- Sun S.Q., Stoflet E.S., Cogan J.G., Strauch A.R., Getz M.J. (1995). Negative regulation of the vascular smooth muscle alpha-actin gene in fibroblasts and myoblasts: disruption of enhancer function by sequence-specific single-stranded-DNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2429-36.
- 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 U S A.* 91(2): 747-51.
- Tajbakhsh S., Rocancourt D., Cossu G., Buckingham M. (1997). Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell.* 89(1): 127-38.
- Takahashi H., Kobayashi H., Matsuo S., Iizuka H. (1995). Repression of involucrin gene expression by transcriptional enhancer factor 1 (TEF-1). *Arch Dermatol Res.* 287(8): 740-6.
- Tallquist M.D., Weismann K.E., Hellström M., Soriano P. (2000). Early myotome specification regulates PDGFA expression and axial skeleton development. *Development.* 127(23): 5059-70.

- Tansey W.P., Herr W. (1997). TAFs: Guilt by association? *Cell (Cambridge Mass.)* 88: 729-32.
- Tateno M., Ukai W., Ozawa H., Yamamoto M., Toki S., Ikeda H., Saito T. (2004) Ethanol inhibition of neural stem cell differentiation is reduced by neurotrophic factors. *Alcohol Clin Exp Res.* 28(8 Suppl Proceedings): 134S-138S.
- Thompson W.R., Nadal-Ginard B., Mahdavi V. (1991). A MyoD1-independent muscle-specific enhancer controls the expression of the beta-myosin heavy chain gene in skeletal and cardiac muscle cells. *J. Biol. Chem.* 266: 22678-88.
- Thomsen D.R., Stenberg R.M., Goins W.F., Stinski M.F. (1984). Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 81: 659-663.
- Thum T., Borlak J. (2001). Reprogramming of gene expression in cultured cardiomyocytes and in explanted hearts by the myosin ATPase inhibitor butanedione monoxime. *Transplantation.* 71(4): 543-52.
- Tobin M.J. (1988). Respiratory monitoring in the intensive care unit. *Am Rev Respir Dis.* 138(6): 1625-42. Review.
- Tomlinson J.J., Boudreau A., Wu D., Atlas E., Haché R.J. (2006). Modulation of early human preadipocyte differentiation by glucocorticoids. *Endocrinology* 147(11): 5284-93.
- Tripathy A., Xu L., Pasek D.A., Meissner G. (1999). Effects of 2,3-butanedione 2-monoxime on Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors) of cardiac and skeletal muscle. *J Membr Biol.* 169(3): 189-98.
- Tsai M.A., Waugh R.E., Keng P.C. (1996). Changes in HL-60 cell deformability during differentiation induced by DMSO. *Biorheology.* 33(1): 1-15.
- Ustanina S., Carvajal J., Rigby P., Braun T. (2007). The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification. *Stem Cells.* 25(8): 2006-16.
- Vaudin P., Delanoue R., Davidson I., Silber J., Zider A. (1999). TONDU (TDU), a novel human protein related to the product of *vestigial (vg)* gene of *Drosophila melanogaster* interacts with vertebrate TEF factors can substitutes for Vg function in wing formation. *Development.* 126: 4807-16.
- Voigtländer J., Leiderer R., Mühlbayer D., Habazettl H. (1999). Time-dependent efficacy of initial reperfusion with 2,3 butanedione monoxime (BDM) on release of cytosolic enzymes and ultrastructural damage in isolated hearts. *Thorac Cardiovasc Surg.* 47(4): 244-50.
- Wahrmann J.P., Winand R., Luzzati D. (1973). Effect of cyclic AMP on growth and morphological differentiation of an established myogenic cell line. *Nat New Biol.* 245(143): 112-3.
- Walsh D.P., Chang Y.-T. (2006). Chemical genetics. *Chem. Rev.* 106: 2476–2530.
- Wang H., Scott R.E. (1993). Inhibition of distinct steps in the adipocyte differentiation pathway in 3T3 T mesenchymal stem cells by dimethyl sulphoxide (DMSO). *Cell Prolif.* 26(1): 55-66.
- Watzl B., Leitzmann C. (1999). Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln
- Weintraub H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75: 1241-44
- Weintraub H., Davis R., Tapscott S., Thayer M., Krause M., Benezra R., Blackwell T.K., Turner D., Rupp R., Hollenberg S., et al. (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science.* 251(4995): 761-6. Review.
- Williams B.A., Ordahl C.P. (1997). Emergence of determined myotome precursor cells in the somite. *Development.* 124(24): 4983-97.
- Wilton S., Skerjanc I. (1999). Factors in serum regulate muscle development in P19 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35(4): 175-7.
- Winchester P.K., Davis M.E., Alway S.E., Gonyea W.J. (1991). Satellite cell activation in the stretch-enlarged anterior latissimus dorsi muscle of the adult quail. *Am J Physiol.* 260(2 Pt 1): C206-12.
- Winter B., Braun T., Arnold H.H. (1993). cAMP-dependent protein kinase represses myogenic differentiation and the activity of the muscle-specific helix-loop-helix transcription factors Myf-5 and MyoD. *J. Biol. Chem.* 268: 9869-9878.
- Xiao J.H., Davidson I., Ferrandon D., Rosales R., Vigneron M., Macchi M., Ruffenach F., Chambon P. (1987). One cell-specific and three ubiquitous nuclear proteins bind in vitro to overlapping motifs in the domain B1 of the SV40 enhancer. *EMBO J.* 6: 3005-13.
- Xiao J.H., Davidson I., Matthes H., Garnier J.-M., Chambon P. (1991). Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* 54: 931-45.

- Xiao Y.F., McArdle J.J. (1995a). Activation of protein kinase A partially reverses the effects of 2,3-butanedione monoxime on the transient outward K⁺ current of rat ventricular myocytes. *Life Sci.* ;57(4): 335-43.
- Xiao Y.F., McArdle J.J. (1995b). Effects of 2,3-butanedione monoxime on blood pressure, myocardial Ca²⁺ currents, and action potentials of rats. *Am J Hypertens.* 8(12 Pt 1): 1232-40.
- Xiau J.H., Davidson I., Matthes H., Garnier J.-M., Chambon P. (1991). Cloning, expression and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell.* 65: 551-68.
- Yabe D., Fukuda H., Aoki M., Yamada S., Takebayashi S., Shinkura R., Yamamoto N., Honjo T. (2007). Generation of a conditional knockout allele for mammalian Spen protein Mint/SHARP. *Genesis.* 45(5): 300-6.
- Yasunami M. (2000). Isolation of a cDNA encoding mouse vestigial-related factor that interacts with the TEAD family transcription factors. Submitted *EMBL GenBank DDBJ database.*
- Yasunami M., Suzuki K., Houtani T., Sugimoto T., Ohkubo H. (1995). Molecular characterization of cDNA encoding a novel protein related to transcriptional enhancer factor-1 from neuronal precursor cells. *J. Biol. Chem.* 270: 18649-54.
- Yockey C.E., Smith G., Izumo S., Shimizu N. (1996). cDNA cloning and characterization of murine transcriptional enhancer factor-1-related protein 1, a transcription factor that binds to the MCAT motif. *J. Biol. Chem.* 271: 3727-36.
- Yoshiji H., Kuriyama S., Ways D.K., Yoshii J., Miyamoto Y., Kawata M., Ikenaka Y., Tsujinoue H., Nakatani T., Shibuya M., Fukui H. (1999). Protein kinase C lies on the signaling pathway for vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis. *Cancer Res.* 59(17): 4413-8.
- Zammit P.S., Golding J.P., Nagata Y., Hudon V., Partridge T.A., Beauchamp J.R. (2004). Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol.* 166(3): 347-57.
- Zammit P.S., Relaix F., Nagata Y., Ruiz A.P., Collins C.A., Partridge T.A., Beauchamp J.R. (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci.* 119(Pt 9): 1824-32.
- Zhang W., Behringer R.R., Olson E.N. (1995). Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev.* 9(11): 1388-99.
- Zhao P., Hoffman E.P. (2004). Embryonic myogenesis pathways in muscle regeneration. *Dev Dyn.* 229: 380-92.
- Ziman M.R., Kay P.H. (1998). A conserved TN8TCCT motif in the octapeptide-encoding region of Pax genes which has the potential to direct cytosine methylation. *Gene.* 223(1-2): 303-8.