

Institut für Physiologische Chemie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
kommissarischer Direktor: Herr Prof. Dr. Thomas Hollemann



Inhibition der Wanderung von Muskelvorläuferzellen durch kleine Moleküle (Signalkaskaden-Inhibitoren)

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von: Stitz, Benjamin
Geboren am: 01. Juli 1980 in Würzburg
Betreuer: Herr Prof. Dr. Dr. Thomas Braun
Gutachter: Herr Prof. Dr. Dr. Thomas Braun
Herr Prof. Dr. Thomas Hollemann
Verteidigung: 07.02.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013263

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013263>]

Kurzreferat

Die Vertebratenmyogenese, also die Entwicklung der Muskulatur beim Vertebraten, ist einerseits von medizinischem Interesse, andererseits aber auch aus Sicht des Entwicklungsbiologen von Bedeutung. Mediziner erhoffen sich, Verletzungen und Erkrankungen der Muskulatur effektiver therapieren oder sogar heilen zu können, wobei einige Forschungsergebnisse bereits erste Erfolge ermöglicht haben und weiterhin zur Hoffnung Anlass geben. Biologen hingegen konzentrieren sich neben therapeutischen Fragestellungen auf die Erforschung der Vertebratenmyogenese mit dem Ziel, dafür ein umfassendes Modell mit universell gültigen Regeln zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein wichtiger Aspekt der Vertebratenmyogenese, nämlich die Migration, also die Wanderung von Muskelvorläuferzellen (MPCs, Muscle Precursor Cells), untersucht. Ziel ist es herauszufinden, welche Signalkaskaden bei der Migration der MPCs eine wichtige Rolle spielen. Hierzu wurde der Einfluss von Inhibitoren (AKT, PKC, MEK, JNK, PI3K), die spezifisch für bestimmte Kaskaden sind, auf die MPC-Migration *in vivo* und *in vitro* untersucht. Ein geeignetes Modell, um die Vertebratenmyogenese *in vivo* zu untersuchen, ist das Hühnchenmodell. Hierbei kann man mikrochirurgische Eingriffe vornehmen, und so gezielt in die Entwicklung des Embryos eingreifen ohne diesen dabei zu töten. In dieser Arbeit geschieht dies durch Injektion der Inhibitoren in die Somiten 16-19 der Keimscheibe des Embryos, die der Ursprung der Zellen, die die Extremitätenmuskulatur bilden, sind. Die Migrationsfähigkeit, sowie der Determinierungs- bzw. Differenzierungsgrad der MPCs, der nach erfolgter Injektion untersucht werden soll, spiegelt sich in der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren wieder (zum Beispiel Lbx1 und Pax3). Die Expression von Lbx1 und Pax3 kann nach Whole mount in situ Hybridisierung verglichen und so beurteilt werden, ob durch die Injektion der Inhibitoren die Migration der MPCs verändert worden ist. Dabei zeigte sich keine Veränderung der Migration durch die Inhibitoren der PKC, MEK, JNK und PI3-K-Signalkaskaden, die Injektion des AKT-Inhibitors führte jedoch zu einem fehlenden Auswachsen der Extremität. Die *in vitro* Experimente bestätigten für die PKC-, MEK-, JNK- und PI3K-Inhibitoren die *in vivo* gemachten Beobachtungen. Zukünftig wäre daher die genaue Untersuchung des Einflusses des AKT-Inhibitors auf die Myogenese von Interesse.

Name: Stitz, Benjamin

Titel: Inhibition der Wanderung von Muskelvorläuferzellen durch kleine Moleküle (Signalkaskaden-Inhibitoren)

Institut: Institut für physiologische Chemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Dissertation, 72 Seiten, 2007

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Extremitätenentwicklung bei Hühnerembryonen | 2 |
| 1.2 Somitogenese | 4 |
| 1.3 Migration und Differenzierung von Muskelvorläuferzellen | 6 |
| 1.4 Zell-Zell-Wechselwirkungen | 10 |
| 1.5 Die Rolle von Signalkaskaden in der Myogenese | 11 |
| 1.5.1 PI-3K/PDK1/AKT-Signalkaskade | 12 |
| 1.5.2 Ras/Raf/MEK/ERK1/2/Signalkaskade | 13 |
| 1.5.3 p38-Signalkaskade | 14 |
| 1.5.4 JNK-Signalkaskade | 15 |
| 1.5.5 PKC-MARCKS-Signalkaskade | 15 |
| 1.5.6 Interaktion zwischen PI3 und p38-Kinase | 16 |
| 1.6 Zielsetzung der Arbeit | 17 |
| 2. Material und Lösungen | 19 |
| 2.1 Material | 19 |
| 2.1.1 Gebrauchswaren | 19 |
| 2.1.2 Enzyme | 19 |
| 2.1.3 Chemikalien | 19 |
| 2.1.4 Antikörper | 20 |
| 2.1.5 Inhibitoren | 20 |
| 2.1.6 Befruchtete Hühnereier | 20 |
| 2.1.7 DNS-Längenstandard | 20 |
| 2.1.8 Zelllinien | 20 |
| 2.1.9 Verwendete Sonden für Whole mount in situ Hybridisierung | 21 |
| 2.2 Lösungen und Puffer | 21 |
| 2.2.1 Lösungen und Medien für molekularbiologische Methoden | 21 |
| 2.2.2 Lösungen für Whole mount in situ Hybridisierung | 23 |
| 2.2.3 Lösungen und Medien für die Zellkultur | 25 |
| 2.2.4 Sonstige Lösungen | 26 |
| 3. Methoden | 27 |
| 3.1 Molekularbiologische Methoden | 27 |
| 3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese | 27 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 3.1.2 Ethanol-fällung von DNA | 27 |
| 3.1.3 Reinigung von Nukleinsäurelösungen | 27 |
| 3.1.4 Verdau von Vektoren mittels Restriktionsendonukleasen | 28 |
| 3.2 Methoden der Zellkultur | 28 |
| 3.2.1 Zellkultivierung | 29 |
| 3.2.2 Passagierung | 29 |
| 3.2.3 Bestimmung der Zellzahl | 29 |
| 3.2.4 Kryokonservierung von Säugerzellen | 30 |
| 3.2.5 Ernte von Zellen | 30 |
| 3.2.6 Chemotaxisanalyse mittels Boyden Chamber Assay | 30 |
| 3.3 Whole mount in situ Hybridisierung | 32 |
| 3.3.1 Herstellung der Probe | 32 |
| 3.3.2 Fixierung, Vorbehandlung und Hybridisierung der Embryonen | 34 |
| 3.3.3 Waschgänge nach Hybridisierung und Inkubation mit Antikörper | 36 |
| 3.3.4 Färbung | 37 |
| 3.4 Histologische Techniken | 37 |
| 3.4.1 Einbetten und Schneiden der Embryonen | 37 |
| 3.4.2 Eosin-Färbung | 38 |
| 3.5 Mikromanipulation an Hühnchenembryonen | 38 |
| 3.5.1 Bedingungen für das Bebrüten von befruchteten Hühnereiern | 39 |
| 3.5.2 Injektion von Signalkaskaden-Inhibitoren in Hühnerembryonen..... | 40 |
| 3.6 Sterilisation von Lösungen und Geräten | 42 |
| 4. Ergebnisse | 43 |
| 4.1 <i>In vivo</i> -Injektion der Signalkaskaden-Inhibitoren | 43 |
| 4.1.1 Wanderung von Muskelvorläuferzellen nach AKT-Inhibitor Injektion | 43 |
| 4.1.2 Wanderung von Muskelvorläuferzellen nach Injektion von MEK, PKC, | 46 |
| JNK und Ly294002-Inhibitoren | 46 |
| 4.2 Wanderung von Muskelvorläuferzellen <i>in vitro</i> | 48 |
| 5. Diskussion | 51 |
| 5.1 Mögliche Ursachen der Auswirkung der AKT-Inhibitor Injektion | 52 |
| 5.1.1 Expressionsmuster von Lbx1 und Pax3 nach AKT-Inhibitor Injektion | 52 |
| 5.1.2 Mögliche Interaktion zwischen dem AKT-Inhibitor und anderen die | 53 |
| Extremitätenentwicklung beeinflussenden Faktoren, insbesondere FGF | 53 |
| 5.2 Injektion der JNK-, MEK-, PKC-PI3-K-Inhibitoren verändert die Expression | 59 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| von Lbx1 und Pax3 nicht | 59 |
| 5.3 Einfluss der Inhibitoren auf die Migration der C2C12-Zellen im Boyden | 62 |
| Chamber Assay | 62 |
| 6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen | 63 |
| 7. Anhang | 64 |
| 7.1 Literaturverzeichnis | 64 |
| 7.2 Fachwörter und Abkürzungen | 70 |
| 7.3 Thesen | 72 |

1. Einleitung

In der Evolution spielt die Entwicklung der Muskulatur eine entscheidende Rolle bei den Vertebraten und somit auch bei den Menschen. Alleine die Tatsache, dass man beim Menschen in vielen, meist lebenswichtigen Organen Muskeln finden kann, zeigt welche Bedeutung einer regelgerechten Muskelentwicklung zukommt. So ist beispielsweise das menschliche Herz ein muskuläres Hohlorgan, die Atmung funktioniert nur durch Muskulatur (das Diaphragma) und auch die Extremitätenmuskulatur ermöglicht wichtige Voraussetzungen für das Überleben einer Art. Sie garantiert die Fortbewegung des Organismus auch über längere Strecken und erlaubt sogar die Durchführung kleinster feinmotorischer Bewegungen.

Die histologische Gliederung der Muskulatur sieht eine Einteilung in drei wesentliche Gruppen vor. Zunächst ist die quergestreifte Muskulatur zu nennen, die es dem Organismus ermöglicht willkürliche Bewegungen durchzuführen und dadurch dessen Mobilität gewährleistet. Sie heißt auch quergestreifte Muskulatur, da ihre Myofibrillen im Gegensatz zu den glatten Muskeln ganz regelmäßig angeordnet sind und dadurch ein erkennbares Ringmuster aus roten Myosinfilamenten und weißen Aktinfilamenten erzeugen. Die gestreifte Muskulatur stammt von den Myotomen der Somiten der Leibeshöhle ab. Die zweite Gruppe, die glatte Muskulatur, stammt dagegen aus dem Mesoderm der Splanchnopleura, ist nicht willkürlich beeinflussbar, wird vom autonomen Nervensystem innerviert und kommt beispielsweise in der Darmmuskulatur vor. Die Herzmuskulatur stellt die dritte Gruppe dar. Diese hat ein eigenes Nervensystem, arbeitet ständig und weist die Querstreifung von Skelettmuskeln auf, kann aber nicht willkürlich gesteuert werden (Schiebler, 1999).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung der quergestreiften Extremitätenmuskulatur. Anhand zweier klinischer Beispiele möchte ich zeigen, welche schwerwiegenden Folgen Fehlentwicklungen der Skelettmuskulatur haben können. Die progressive Muskeldystrophie Typ Duchenne (DMD) ist nach der Mukoviszidose die zweithäufigste Erbkrankheit mit Todesfolge bei Jungen. Dieses Krankheitsbild bewirkt, dass es zu einer Degeneration der Muskelzellen kommt und die Betroffenen nach und nach keine Kraft mehr haben, sie kaum noch in der Lage sind zu atmen, zu sprechen, zu essen und es ihnen zum Schluss nicht einmal mehr möglich ist die Augen zu öffnen. Ursächlich für diese Krankheit ist eine Mutation (Deletion, Punktmutation, Duplikation) des Dystrophin Gens mit der Konsequenz, dass das Protein Dystrophin gar nicht oder nur in Spuren in den Muskelzellen vorhanden ist. Bis heute gibt es nur Therapien, die das Fortschreiten der

Krankheit verzögern, eine Heilung ist noch nicht möglich, wobei es aber vielversprechende Ansätze gibt. Erfolgsversprechend ist beispielsweise der Transfer des Exons eines ganzen oder verkürzten Dystrophin Gens durch Viren, Plasmide oder Myoblasten in die Muskelzelle, oder aber auch der Einsatz von Stammzellen. Diese sind Zellen, die noch nicht ausdifferenziert sind, das heißt also ihre spätere Verwendung ist noch offen (Scheuerbrandt, 2003). Handelt es sich um verletzte Muskelzellen, die sich regenerieren, dann erhöht sich die Zahl der Muskelstammzellen bis auf das Zehnfache. Diese Zellen sind myogen und können sich zu Myoblasten und später Muskelzellen entwickeln, wie Versuche mit Zellkulturen und Mäusen zeigten. Ausgelöst wurde diese Aktivierung durch Wnt-Proteine, die aus der Embryonalentwicklung bekannt sind und wohl auch bei der Regeneration von verletzten Muskelzellen eine Rolle spielen (Rudnicki, 2003). Ein anderes, wenn auch viel selteneres, klinisches Beispiel ist das Waardenburg Syndrom Typ III. Bei diesem Syndrom wird, neben anderen Störungen wie Albinismus, von schwerwiegenden Extremitätenfehlbildungen berichtet. Hierbei liegt eine Mutation des Pax3 Gens auf Chromosom 2q37 vor, ebenfalls ein Gen welches in der Entwicklung der Extremitätenmuskulatur eine entscheidende Rolle spielt (Zlotogora et al., 1995).

Wie anhand der beiden klinischen Beispiele veranschaulicht, kann Grundlagenforschung im Bereich der Myogenese der Extremitäten zum Verständnis des komplexen Entwicklungsgeschehens und daraus resultierender Krankheitsbilder beitragen.

Um neue Erkenntnisse im Bereich der Entwicklung der Extremitätenmuskulatur zu gewinnen, eignen sich Tiermodelle anhand derer wissenschaftliche Experimente durchgeführt werden können. Dabei hat sich neben der Maus vor allem das Hühnchen als ausgezeichneter Modellorganismus der Vertebratenmyogenese etabliert, um Entwicklungsvorgänge wie Musterbildung, Entstehung von Positionsinformationen, Induktion, Formveränderung und Zelldifferenzierung zu analysieren. Ein besonderer Vorteil des Modellsystems „Hühnchen“ besteht darin, dass am Ei relativ unproblematisch mikrochirurgische Eingriffe vorgenommen werden können und so eine Manipulation der Entwicklung des Embryos möglich ist, ohne diesen dabei zu töten.

1.1. Extremitätenentwicklung bei Hühnerembryonen

In Hühnerembryonen beginnen sich die Extremitäten ab dem dritten Tag nach der Eiablage zu entwickeln. Aus dem Körper sprießen die Extremitätenanlagen oder -knospen aus, woraus sich dann die Gliedmaßen entwickeln. Nach zehn Tagen sind bereits die wesentlichen

Merkmale der Extremität sichtbar. Um die zeitliche Abfolge der Extremitätenentwicklung in den Gesamtprozess der Entwicklung besser einordnen zu können, eignet sich zur Veranschaulichung die Abbildung 1.1. Die Wirbeltierextremität hat drei Entwicklungsachsen. Die proximo-distale Achse erstreckt sich vom Extremitätenstamm bis zur Spitze, die dorso-ventrale Achse würde beim Menschen vom Rücken zur Brust verlaufen, und die antero-posteriore verläuft parallel zur Längsachse des Körpers.

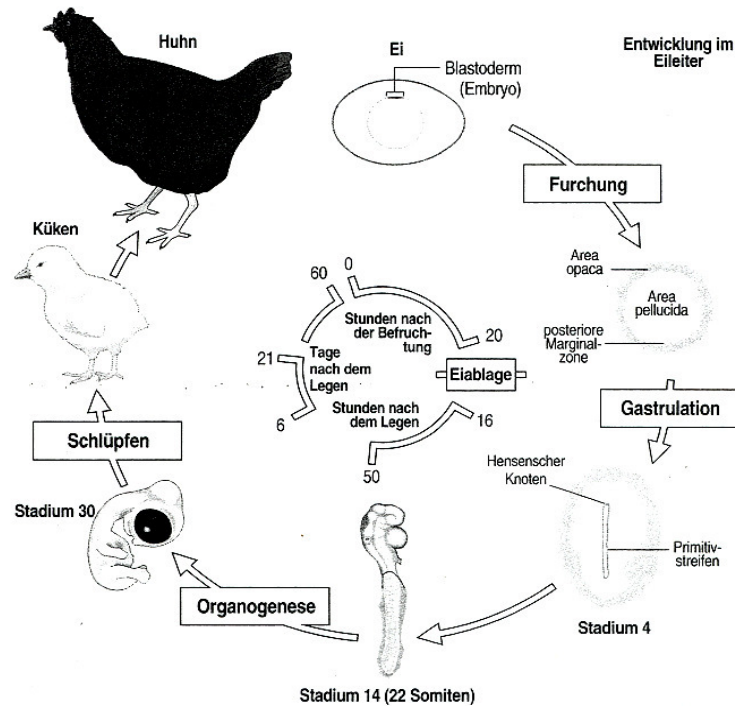


Abb. 1.1: Lebenszyklus des Huhns. Bei der Eiablage ist die Furchung abgeschlossen und das Blastoderm liegt dem Dotter auf. Nach der Gastrulation bildet sich der Primitivstreifen. Wenn der Hensenscher Knoten zurückgebildet wird, entstehen die Somiten. Im Stadium 14 (HH 14) wurden die Injektionen vorgenommen. Darstellung aus Wolpert, 1999.

In der frühen Extremitätenknospe beobachtet man vor allem zwei Zelltypen, die innen liegenden mesenchymalen Mesodermzellen und die außen liegende Schicht epithelialen Ektoderms. Der größte Teil der Extremität entwickelt sich aus dem mesenchymalen Kern, wohingegen die späteren Muskelzellen aus den Somiten in die Knospe einwandern. Es gibt zwei entscheidende Organisationszentren in der Gliedmaßenknospe. Zum einen die apikale Ektodermleiste, eine Verdickung des Ektoderms, und zum anderen die polarisierende Region. An der Spitze der Knospe befindet sich außerdem eine Wachstumszone, die direkt unterhalb der apikalen Ektodermleiste liegt. Diese apikale Ektodermleiste spielt eine wichtige Rolle im Entwicklungsprozess, da sie das Wachstum durch die Aufrechterhaltung der Wachstumszone

induziert. In dieser Wachstumszone erhalten Zellen ihre positionale Identität. Beim Huhn werden wesentliche Signale der apikalen Leiste durch Proteine der FGF-Familie (Fibroblast Growth Factor, Fibroblastenwachstumsfaktor) vermittelt. So kann beispielsweise das FGF 4 Protein die apikale Leiste funktionell ersetzen und eine nahezu normal ausgebildete Extremität entstehen lassen. Die polarisierende Region, auch als Zone polarisierender Aktivität bezeichnet, befindet sich am posterioren Rand des Mesenchyms und dirigiert die Musterbildung längs der antero-posterioren Achse. Entfernt man einem Hühnerembryo die distale Hälfte einer Extremitätenknospe, so entwickelt sich die betreffende Extremität normal. Dagegen führt die Entfernung des proximalen Teils mit der polarisierende Region zu einer abnormen Gliedmaßenentwicklung. Eine entscheidende Rolle in der polarisierenden Region kommt dem Sonic-hedgehog-Protein zu, welches dort exprimiert wird und offenbar in Form eines Gradienten als Positionssignal dient. Ein solches diffusionsfähiges Morphogen dringt in das Gewebe ein, wobei seine Konzentration mit steigender Entfernung von der Polarisierungsregion abnimmt. Der jeweils vorgefundene Konzentrationswert dient einer Zelle als Maß, wie weit sie von der polarisierenden Region am posterioren Knospenrand entfernt ist und so wird ihre Position auf der anterior-posterioren Achse festgelegt. Die dorso-ventrale Polarität wird durch das Ektoderm bestimmt, wobei die Wnt-Familie eine entscheidende Rolle spielt. Weiterhin geben Hox-Gene die Körperpositionen längs der antero-posterioren Achse an und liefern offenbar auch Positionswerte in den Gliedmaßen (Wolpert, 1999).

1.2. Somitogenese

Wie bereits erwähnt, stammen die Muskelzellen einer Extremität nicht aus der Knospe, sondern wandern aus den Somiten in die Extremitäten ein. Somiten sind ballartige Blöcke aus mesodermalem Gewebe, die nach der Gastrulation aus dem Mesoderm hervorgehen. In den frühen Entwicklungsstadien lässt sich der Embryo in drei Hauptkomponenten einteilen: Ekto-, Endo- und Mesoderm. Das Mesoderm kann man wiederum in fünf verschiedene Bereiche einteilen: Chordamesoderm, intermediäres Mesoderm, laterales Plattenmesoderm, Kopfmesenchym und paraxiales Mesoderm.

Das Chordamesoderm bildet das Notochord, dessen wichtige Funktion die Induktion der Bildung des Neuralrohrs und die Festlegung der antero-posterioren Achse ist. Das intermediäre Mesoderm bildet das Urogenitalsystem, in das zu einem späteren Zeitpunkt die Keimzellen einwandern. Aus dem lateralen Plattenmesoderm entstehen das Herz, die

Blutgefäße und die mesodermalen Strukturen der Gliedmaßen. Das Kopfmesenchym bildet das Bindegewebe und einen Teil der Gesichtsmuskulatur. Das paraxiale Mesoderm, das sich auf der linken und rechten Seite des Neuralrohrs befindet, bildet fast die gesamte Skelettmuskulatur des Körpers. Außerdem ist es noch für die Entstehung des axialen Skeletts und der Dermis verantwortlich (Gilbert, 2000). Die Bildung der Skelettmuskulatur läuft in einem mehrstufigen Prozess ab, der räumlich und zeitlich genau koordiniert ist. Den ersten Schritt hierbei nennt man Somitogenese. Die Somiten bilden sich dabei im mesodermalen Bereich, der anterior zu dem in posteriorer Richtung wandernden Hensenschen Knoten liegt. Zwischen dem Knoten und dem zuletzt gebildeten Somiten gibt es einen unsegmentierten Bereich - das präsomitische Mesoderm. Veränderungen der Zellform und der interzellulären Kontakte im präsomitischen Mesoderm führen zur Bildung von getrennten Zellblöcken, den Somiten. Diese entstehen paarweise. Auf jeder Seite der Chorda bildet sich gleichzeitig je ein Somat. In Abhängigkeit ihrer Position entlang der Längsachse zu speziellen Achsenstrukturen differenzieren die Somiten, um so beispielsweise im anterioren Bereich Halswirbel zu bilden und im weiter posterior gelegenen Abschnitt Brustwirbel und Rippen zu entwickeln (Beddington et al., 1999). Um differenzieren zu können, bedarf es jedoch der Wechselwirkung mit den umliegenden Epithelien, die unter anderem verschiedene Wachstumsfaktoren sezernieren, wie zum Beispiel BMP4 (bone morphogenetic protein) und FGF, die im lateralen Plattenmesoderm gebildet werden. Weitere Epithelien, die neben dem lateralen Plattenmesoderm Morphogengradienten bilden, sind das dorsale Ektoderm und das Notochord, die die Differenzierung der Somiten ebenfalls regulieren (siehe Abbildung 1.2).

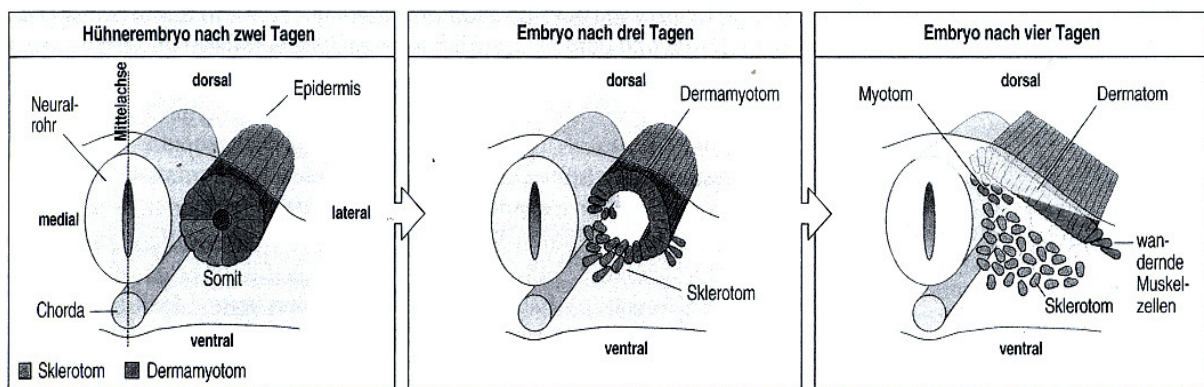


Abbildung 1.2: Der Anlagenplan eines Somiten im Hühnerembryo. Aus dem ventral-medialen Quadranten (heller) entstehen Sklerotomzellen. Der restliche Somat, das Dermamyotom, bildet Dermatom und Myotom, aus dem sich die Dermis und die gesamte Rumpfmuskulatur entwickeln. Außerdem entstehen hier Muskelzellen, die in die Extremitätenknospe einwandern. Darstellung aus Beddington et al., 1999.

Der ventro-mediale Teil des Somiten bildet das Sklerotom, aus welchem sich das axiale Skelett bildet. Die medialen Wände der verbleibenden Somiten strecken sich und kommen unter dem Ektoderm als Dermamyotom (Dermatom) zum Liegen. Aus denjenigen Somiten, die auf Höhe der Extremitätenknospe liegen, lösen sich Skelettmuskelvorläuferzellen von der lateralen Lippe des Dermamyotoms und wandern gezielt in die Extremität ein. Kennzeichnend für die verschiedenen Somitenbereiche ist, dass sie in der Lage sind, hochspezialisiertes Gewebe zu bilden. Aus den Zellen des hypaxialen Dermamyotoms geht beispielsweise die hypaxiale Muskulatur hervor, zu der die Diaphragma- und Zungenmuskulatur, die Extremitäten- und die Schultermuskulatur gehören (Dietrich et al., 1999).

1.3. Migration und Differenzierung von Muskelvorläuferzellen

Muskelvorläuferzellen befinden sich zu Beginn der Myogenese in einem undifferenzierten Stadium und bleiben auch während der Migration in diesem vermehrungsfähigen Zustand. Erst wenn die Muskelvorläuferzellen ihr endgültiges Ziel erreicht haben, setzt die Differenzierung der Myoblasten zu Myozyten und somit auch der Zellzyklusarrest ein. Ein kleiner Teil der Zellen behält jedoch ihr früheres Entwicklungspotential und ist bei Verletzungen der Muskulatur Ausgangspunkt für eine Regeneration des Gewebes. Diese Zellen heißen Satellitenzellen und unterliegen nach Aktivierung einem Differenzierungsprozess, der dem der embryonalen Myogenese ähnelt.

Viele verschiedene Faktoren haben Einfluss auf die Migration und Differenzierung der Muskelvorläuferzellen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Erforschung des Zusammenspiels von Transkriptionsfaktoren (zum Beispiel MRFs, MEFs, siehe unten) und die Wirkung von Chemoattraktanten (zum Beispiel FGF, HGF, IGF, siehe unten) gelegt (Neuhaus et al., 2006). Weiterhin wird auch die Rolle anderer Faktoren auf die Myogenese diskutiert, wie zum Beispiel die der Histon modifizierenden Proteine (McKinsey et al., 2000). Eine sehr wichtige Gruppe von Transkriptionsfaktoren ist die MRF-Familie (muscle regulatory factors). MyoD wurde als erstes Mitglied der MRF-Familie entdeckt. Es ist in der Lage *in vitro* bei Nicht-Muskelzellen einen Muskelphänotypen zu induzieren (Davis et al., 1987). Anschließend wurden weitere Mitglieder der MRF-Familie entdeckt: Myf5, Myogenin und MRF4. MRFs sind basische Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren (bHLH) die durch Bindung an spezifische, cis-aktive DNA-Elemente im Promotorbereich der Zielgene (E-Box) die muskelspezifische Expression dieser Gene aktivieren. Expressionsanalysen *in vitro* haben

gezeigt, dass Myf5 und MyoD in Muskelvorläuferzellen gebildet werden und für deren Determinierung verantwortlich sind, während MRF4 und Myogenin erst zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert werden, wenn die Differenzierung von Myoblasten zu Myozyten schon im Gange ist. MRF4 und Myogenin dienen dann der terminalen Differenzierung der Muskelvorläuferzellen (siehe Abbildung 1.3).

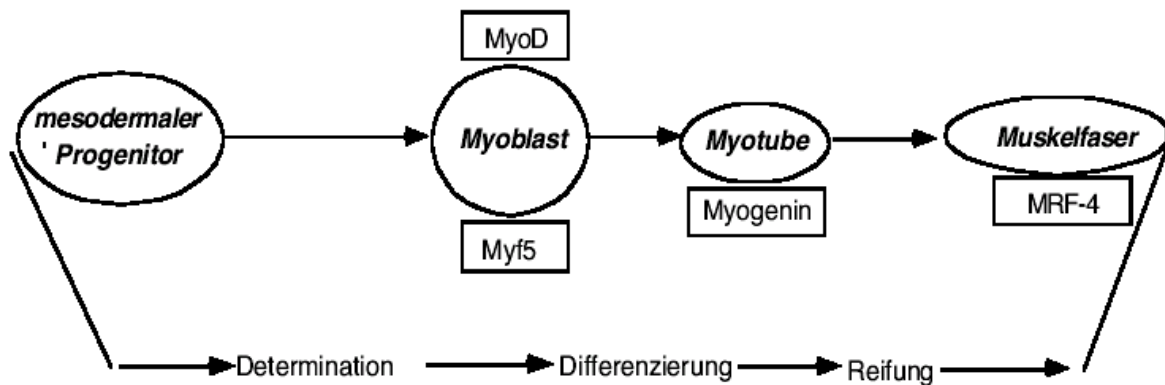


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Muskeldifferenzierung.

Sicher ist, dass alle Mitglieder der MRF-Familie in der Lage sind, den Phänotypenwechsel von einer Nicht-Muskelzelle zu einer Muskelvorläuferzelle *in vitro* zu induzieren. Interessant ist weiterhin, dass die Expression der verschiedenen Transkriptionsfaktoren einem genauen zeitlichen Programm unterliegt, wobei sich die Expressionsmuster der einzelnen Faktoren durchaus überlagern können. *In vivo* zeigt sich jedoch, dass der Ausfall von Myf5 oder MyoD nicht zum totalen Ausfall der Myogenese führt (Rudnicki et al., 1992; Kaul et al., 2000). So zeigten Myf5-mutante Mäuse zwar schwerwiegende Fehlbildungen (die Rippen zeigten keinen Kontakt zum Sternum, reine Myf 5-Knockouts zeigten jedoch keinen Rippenphänotyp), die Skelettmuskelentwicklung war jedoch nicht verändert (Kaul et al., 2000). Daher liegt die Vermutung nahe, dass MyoD, welches ebenfalls in einem frühen Stadium der Myogenese exprimiert wird, den Verlust des Myf5-Faktors kompensieren kann. Somit ist entweder Myf5 oder MyoD für die Determinierung der Muskelvorläuferzellen und für die Induktion der Myogenese erforderlich. Folglich führt ein Doppel-Knockout zu einem vollständigen Ausbleiben der Myogenese (Braun et al., 1992). Neben der MRF-Familie gibt es eine zweite Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die MEF Gruppe (muscle-enhancer-bindende Faktoren, zum Beispiel MEF2A-D), die den Fortschritt der Muskeldifferenzierung beschleunigt. Diese ist ebenfalls in der Lage myogene Determinierung und Differenzierung zu

induzieren. *In vivo* Studien haben gezeigt, dass MEF-Gene während der Embryogenese in Herz-, Skelett- und glatter Muskulatur exprimiert werden. Die MEFs interagieren dabei außerdem mit transaktivierenden N- und C-terminal gelegenen Bereichen der MRFs. Ein Beispiel für die Wechselwirkung zwischen der MEF und MRF-Familie sind Myogenin und MEF2C, da eine korrekte Expression von Myogenin nur mit der Hilfe von MEF2C möglich ist. Trotzdem kann man auch bei einer Mutation von MEF2C keine offensichtlichen Skelettmuskeldefekte feststellen (Neuhaus et al., 2006).

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren einem komplexen Ablauf unterliegt, bei dem die Wegnahme eines Bausteins nicht zum Einsturz des ganzen Systems führen würde. Vielmehr liegt ein System vor, welches durch Interaktionen und Kompensationsmechanismen zwischen den einzelnen Faktoren gekennzeichnet ist und auf das mehrere externe Signale unterstützenden, beziehungsweise hemmenden Einfluss ausüben können.

Die Migrationsfähigkeit, sowie der Determinierungs- beziehungsweise Differenzierungsgrad der Muskelvorläuferzellen spiegelt sich insbesondere in der Expression bestimmter Gene wieder, für die spezifische Funktionen in der MPC-Entwicklung bekannt sind. Wichtige Faktoren dieser Gruppe sind Pax3, Lbx1 und c-met, die alle in hypaxialen Muskelvorläuferzellen exprimiert werden (Schafer und Braun, 1999; Dietrich et al., 1999). Pax3 ist ein paired box Transkriptionsfaktor, welcher zu Beginn der Myogenese im paraxialen Mesoderm exprimiert wird, sich später jedoch auf das Dermamyotom beschränkt. Zellen, die aus der lateralen Dermamyotomlippe stammen und Pax3 exprimieren, delaminieren und migrieren bis sie schließlich die Zungen-, Zwerchfell- und Extremitätenmuskulatur bilden (Bober et al., 1994). Welche essentielle Rolle Pax3 in der Myogenese spielt, zeigt sich in Pax3-mutanten Mäusen bei denen sich keine Extremitätenmuskulatur entwickelt. Andere Muskelgruppen, wie zum Beispiel die der vorderen Bauchwand, bleiben dagegen völlig unbeeinflusst. Pax3 spielt also eine entscheidende Rolle in der Migration der hypaxialen Muskelvorläuferzellen. Desweiteren ist Pax3 verantwortlich für die Aktivierung der Expression von c-met, einer Rezeptor-Tyrosinkinase, die im ganzen Dermamyotom gebildet wird und zusammen mit seinem Liganden HGF (Hepatozyte Growth Factor, Hepatozyten, Wachstums Faktor) vor allem für die regelgerechte Delamination der hypaxialen Muskelvorläuferzellen von der lateralen Dermamyotomlippe zuständig ist. HGF bewirkt zusammen mit c-met einerseits die Delamination, andererseits kann HGF die austretenden Zellen in einem undifferenzierten Zustand halten, wodurch das Potential zur Migration und Proliferation aufrechterhalten bleibt. Weiterhin beeinflusst Pax3 neben anderen Faktoren die

Expression des homöoboxbeinhaltenden Transkriptionsfaktors Lbx1, welcher spezifisch in migrierenden, hypaxialen Muskelvorläuferzellen exprimiert wird. Mutationen von Lbx1 führen zu einem perinatalen Tod und zu einem vollständigen Fehlen der hinteren Gliedmaßenmuskulatur, wohingegen bei den vorderen Gliedmaßen nur die distale Extensorgruppe fehlt. Die Zungen und Diaphragmamuskulatur, die ebenfalls zur hypaxialen Muskulatur gehört, formt sich weitgehend normal. Diese Muskelpartien stammen von Muskelvorläuferzellen ab, die über den ventralen Weg ihr Ziel erreichen. Somit scheint der ventrale Migrationsweg nicht auf die Expression von Lbx1 angewiesen zu sein (Schafer und Braun, 1999; Brohmann et al., 2000; Gross et al., 2000). Dies bestätigt wiederum die Annahme, dass für eine regelgerechte Wanderung der Muskelvorläuferzellen mehr als ein isolierter Faktor benötigt wird und somit die Interaktion zwischen verschiedenen Bausteinen eine entscheidende Rolle spielt. Dennoch ist Lbx1 ein Marker für hypaxiale Muskelvorläuferzellen aus der lateralen Dermanyotomie und gewährleistet eine zielgenaue Wanderung eines großen Teils der Muskelvorläuferzellen der Gliedmaßen (Neuhaus et al., 2006).

Für die Migration der Muskelvorläuferzellen spielen neben den oben beschriebenen Transkriptionsfaktoren auch Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle. Neben dem bereits genannten HGF, sind vor allem die FGFs und die IGFs (Insulin ähnliche Wachstumsfaktoren) zu nennen. Dabei nehmen die IGFs Einfluss auf eine Vielzahl myogener Prozesse. Sie steuern den Bestand und das Voranschreiten des myogenen Programms der wandernden Muskelvorläuferzellen. Außerdem haben sie die Eigenschaft sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung der Myoblasten zu stimulieren, die Expression von Myogenin zu fördern und zur terminalen Differenzierung von Myoblasten zu ausgereiften Myotuben beizutragen (Florini et al., 1996). Weiterhin spielen die IGFs auch eine wichtige Rolle bei der Koordinierung der Muskelregeneration, der Reinnervierung verletzter Muskeln und der Stimulation des Wachstums der Muskelmasse im Alter (Barton-Davis et al., 1998; Wilson et al., 2003). Die zweite Wachstumsfaktorengruppe ist die FGF-Gruppe, die sogar in der Lage ist, zur Ausbildung zusätzlicher Extremitätenknospen bei Hühnchenembryonen zu führen (Cohn et al., 1995). Die FGFs können außerdem, unter bestimmten Umständen, die Proliferation, die Differenzierung und die Migration von Muskelvorläuferzellen begünstigen. Es zeigte sich beispielsweise, dass die Inhibition des FGFR4-Signals zu einem kompletten Verlust der Extremitätenmuskulatur führen kann. Dieser Effekt konnte jedoch durch Zugabe von exogenen FGFs gestoppt werden (Marics et al., 2002).

1.4. Zell-Zell-Wechselwirkungen

Nachdem jetzt die wesentlichen Regulationsmechanismen der Entwicklung der Extremitätenmuskulatur vorgestellt sind, soll nun die Interaktion der Muskelvorläuferzellen mit der Umgebung, also mit anderen Zellen erwähnt werden. Dieses Wechselspiel der MPCs mit ihrer Umgebung beeinflusst deren Wanderung, und sollte daher in dieser Arbeit kurz aufgeführt werden.

Neben den Wachstumsfaktoren und dem Transkriptionsprogramm, spielen die extrazelluläre Matrix und die Oberflächenmoleküle der Zellen eine entscheidende Rolle für eine regelgerechte Entwicklung der MPCs. Es gibt mehrere verschiedene Molekülklassen, die für die Herstellung von Zell-Zell-Kontakten von Bedeutung sind: Integrine, klassische Cadherine, desmosomale Cadherine, Mitglieder der Immunglobulinfamilie und Selectine.

Integrine sind Rezeptorproteine, die die Zellen mit der extrazellulären Matrix verbinden und auch auf Signale von außen reagieren können. Die extrazellulären Domänen dieser Transmembranproteine haben Bindungsstellen für Adhäsionsproteine, wie beispielsweise Laminin oder Fibronectin, und verbinden diese mit dem Zytoskelett. Dies ist für die Differenzierung von Muskelvorläuferzellen von Bedeutung, da der Kontakt zu Laminin und Fibronectin das Adhären und somit eine koordinierte Bewegung der Zellen während der Migration erst ermöglicht (McDonald et al., 1995).

Neben den Integrinen leisten vor allem die klassischen Cadherine den gewebespezifischen Zusammenhalt der Zellen. Cadherine (Ca-Adherine) sind Kalzium bindende, transmembrane Adhäsionsproteine, welche an der Zell-Zelladhäsion beteiligt sind. Die Superfamilie der Cadherine besteht allein bei Wirbeltieren derzeit aus über 300 Proteinen. Gemeinsam sind allen Cadherinen mehrere extrazelluläre Cadherin-Motive, welche auch als Ectodomänen bezeichnet werden, transmembranäre Sequenzen und cytoplasmatische Domänen. Von Bedeutung für die Prozesse der Myogenese sind vor allem die M-, N- und R-Cadherine. Diese sind in der Lage, bei der Wanderung der Muskelvorläuferzellen vom Dermamyotom in die Extremitätenkospe Zellkontakte zu vermitteln, um so orientierende Positionssignale und Strukturen zu liefern. Desweiteren ermöglichen die Cadherine die Fusion von Myoblasten zu Myotuben (Charrasse et al., 2003).

1.5. Die Rolle von Signalkaskaden in der Myogenese

Die Differenzierung, Reifung und Regeneration der Skelettmuskulatur ist, wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, ein Prozess, der durch die Wechselwirkung unterschiedlicher Faktoren gekennzeichnet ist. Einerseits sind dies Signalwege, die durch Hormone und Wachstumsfaktoren gesteuert werden, andererseits spielt das intrinsische genetische Programm eine entscheidende Rolle, welches vor allem durch die myogenen Transkriptionsfaktoren der MyoD- und Mef2-Familie kontrolliert wird.

Die Zielsetzung dieser Arbeit lag darin, den Einfluss fünf verschiedener Signalkaskaden auf die Wanderung von Muskelvorläuferzellen *in vivo* zu untersuchen. Die ausgewählten Signalkaskaden sind *in vitro* dafür bekannt, dass sie an unterschiedlichen Stellen an der Myogenese beteiligt sind. Um diese Ergebnisse auch *in vivo* zu untersuchen, wurden, nach mikrochirurgischer Präparation von Hühnchenembryonen, spezifische Inhibitoren der ausgewählten Signaltransduktionswege in die Somiten des Embryos injiziert, und die weitere Entwicklung des Embryos analysiert.

Es sind mittlerweile eine Vielzahl von Signalkaskaden bekannt, die in die Migration der Muskelvorläuferzellen an unterschiedlichen Stellen eingreifen. Die folgenden Betrachtungen sollen dabei eine Übersicht über die Signalkaskaden geben, die durch die in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitoren gehemmt werden und die von besonderem Interesse für die Myogenese sind.

Die frühe Phase der Muskeldifferenzierung in C2C12-Zellen ist, wenn man sie von der Seite der Signaltransduktion betrachtet, im Wesentlichen durch drei Signalkaskaden und dessen Proteinkinasen gekennzeichnet. Die Erste ist die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K), die Zweite, die durch extrazelluläre Signale regulierte ERK1/2 Kinase (p42 und p44), und die Dritte die p38 Kinase. Die jeweiligen Inhibitoren dieser Proteinkinasen zeigten *in vitro* einen hemmenden Einfluss auf das Entwicklungspotential der Zelle und damit auf das initiale Stadium der Myogenese (Kwieceńska et al., 2005).

Proteinkinasen sind Enzyme, die den Transfer einer Phosphatgruppe von einem Donor auf einen Aminosäurerest von Proteinen katalysiert. Diese Serin/Threonin-Kinasen teilt man grob in die folgenden Untergruppen ein: Phosphorylase Kinase, Proteinkinase A, Proteinkinase B, und Proteinkinase C. Der erwähnte Mechanismus der Proteinphosphorylierung kann nun in der Signaltransduktion genutzt werden. Die Phosphorylierung bedingt dann, durch die erzielte Ladungsveränderung, entweder eine Aktivierung oder eine Inhibierung des Zielproteins. Meist phosphorylieren die Proteinkinasen spezifisch einen Aminosäurerest, wobei es jedoch

auch biphasische Proteinkinasen gibt, die in der Lage sind, zwei Aminosäurereste zu phosphorylieren. Die Proteinkinasen selber können auch durch unterschiedliche Mechanismen reguliert werden, wie zum Beispiel durch Aktivatorproteine, second messenger, Phosphorylierung oder auch durch die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitorproteine (Löffler et al., 2003).

1.5.1. PI-3K/PDK1/AKT-Signalkaskade

Die Erste von drei für die Myogenese wesentlichen Signalkaskaden, ist die Phosphatidylinositol-3K/PDK1/AKT Signalkaskade. AKT ist ein phosphorylierendes Protein im Signaltransduktionsweg, welches auch als Proteinkinase B (PKB) bekannt ist. Die vor allem in der englischsprachigen Literatur als AKT bezeichnete Kinase ist ein Enzym des PI-3K/AKT-Signalwegs, der auf zahlreiche Prozesse wie das Überleben, die Apoptose und die Proliferation von Zellen Einfluss nimmt. Während der Myogenese nimmt AKT ebenfalls eine wichtige Rolle ein. Die Blockierung des AKT-Signalweges *in vitro* führt zur Inhibition der Myogenese, wohingegen aus einer Aktivierung eine Hypertrophie der gebildeten Myotuben resultiert (Cabane et al., 2004). AKT wird durch substratspezifisches Binden von Wachstumsfaktoren an Rezeptortyrosinkinasen im extrazellulärem Raum aktiviert. Diese Bindung aktiviert die PI3-Kinase durch Phosphorylierung, was zu der Phosphorylierung von Phosphoinositiden wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat an der 3'-OH-Stelle des gebundenen Inositolgerüsts führt. Phosphatidylinositoltrisphosphat ist das Substrat, welches letztlich an die AKT-Kinase bindet und diese somit aktiviert. Für die vollständige Aktivierung wird AKT zusätzlich an zwei Schlüsselpositionen, nämlich Threonin 308 und Serin 473 phosphoryliert (Schneid et al., 2002). In den hier geschilderten Signalweg kann an verschiedenen Stellen eingegriffen werden. Zum einen kann die durch die PI3-Kinase vermittelte Aktivierung durch den Inhibitor Ly294002 verhindert werden (Kaliman et al., 1999), zum anderen kann durch die Inhibition mit einem AKT-Inhibitor die AKT-Kinase direkt gehemmt werden. Die Inhibition der PI3-Kinase oder ihres „downstream target“ AKT blockiert in Zellkulturexperimenten die Muskeldifferenzierung. Auf der anderen Seite führt die Expression einer konstitutiv aktiven PI3-Kinase und AKT zur Induktion der myogenen Differenzierung (Jiang et al., 1999).

Um den bisher skizzierten PI3-Kinase-AKT Signalweg nach heutigem Erkenntnisstand vollständig zu beschreiben, muss noch der Einfluss des Wachstumsfaktors „Insulin like Growth Factor“ (IGF) auf diese Signalkaskade erwähnt werden. IGFs nehmen eine

Schlüsselrolle in der Muskelentwicklung im Embryo und der Aufrechterhaltung des ausgereiften Muskels beim Erwachsenen ein, wobei die für diese Effekte verantwortlichen Signalwege bisher noch nicht vollständig verstanden werden. Mehrere Labore haben unterschiedliche Einflüsse, der durch IGF aktivierten PI3-Kinase/AKT Signalkaskade auf die Muskeldifferenzierung beschrieben (Tamir und Bengal, 2000; Xu und Wu, 2000; Bodine et al., 2001; Vandromme et al., 2001; Takahashi et al., 2002). Momentan geht man davon aus, dass die Insulin ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren in der Lage sind, die Differenzierung von Muskelzellen in Zell- und Gewebekulturen zu fördern (Rommel et al., 1999; Musaro und Rosenthal, 1999) und außerdem das Muskelwachstum, die Reifung und Regeneration von Myoblasten positiv zu beeinflussen (Barton et al., 2002; Paul und Rosenthal, 2002). Die Wirkungen von IGF-I und IGF-II im Muskel werden über den IGF-I Rezeptor vermittelt, einer transmembranären Tyrosin-Proteinkinase, die durch mehrere Wachstumsfaktoren stimuliert werden kann (Nakae et al., 2001). Um exemplarisch einen vollständigen Signalweg aufzuzeigen, eignet sich das folgende Beispiel: Lawlor und Rotwein (2000) konnten zeigen, dass in Zellkulturen endogen gebildetes IGF-II über den IGF-I Rezeptor die Phosphatidylinositol 3-Kinase und AKT stimuliert, wodurch dann die Expression des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21/waf-1 induziert wird. Dieser autokrine Mechanismus gewährleistet die Entwicklungsfähigkeit der Myoblasten in den frühen Phasen der Muskeldifferenzierung. In nachfolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass der vorher geschilderte Signalweg weiterhin in der Lage ist, Muskeldifferenzierung zu initiieren, indem er die Expression von Myogenin induziert (Tureckova et al., 2001).

1.5.2. Ras/Raf/MEK/ERK1/2-Signalkaskade

Die zweite für die frühe Myogenese bedeutsame Kinase ist die, zur Familie der Extracellulär-signal Regulated Kinasen, kurz ERK, gehörende ERK1/2 Kinase. Es sind bisher acht Isoformen dieses Enzyms bekannt, die mit ERK eins bis acht bezeichnet werden. Sie gehören zu den Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAP-Kinasen) und zählen gemäß ihrer modifizierten Gruppen zu den Serin/Threonin-Kinasen. Die intrazelluläre Signaltransduktion über die ERK-Kaskade wird durch verschiedene extrazelluläre Signale aktiviert, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, und reguliert ihrerseits zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die Proliferation und die Zelldifferenzierung von Myoblasten (Gredinger et al., 1998).

Ein für die Entwicklungsfähigkeit und Differenzierung von C2C12-Myoblasten wichtiger Signaltransduktionsweg, der über die ERK1/2 Kinase vermittelt wird, ist der Ras/Raf/MEK/ERK1/2 Signalweg (Gredinger et al., 1998 und Sarbassov et al., 1997). Mehrere Proteine sind als potentielle Effektoren des Ras-Signalwegs identifiziert worden, wobei die Phosphatidylinositol 3-Kinase, die Ral-Familie und die Raf-Familie am besten untersucht sind (Joneson und Bar-Sagi., 1997). Die Raf-Familie gehört zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen und wird in die Untergruppen Raf1, Raf-A und Raf-B unterteilt. Die Interaktion von Ras mit Raf führt zu einer Aktivierung der MEKs. Die MEKs sind eine Obergruppe für die MAP und ERK-Kinasen. Die MAP-Kinase phosphoryliert nun ihrerseits die ERKs, was zur Phosphorylierung von mehreren Transkriptionsfaktoren führt. Somit stellen die ERKs eine Art Bindeglied zwischen Signalproteinen und Transkriptionsregulatoren dar, wodurch dann wiederum eine Änderung der Genexpression herbeigeführt werden kann (Missero et al., 2000). In den hier beschriebenen Ras/Raf/MEK/Erk1/2-Signalweg wurde nun eingegriffen, indem ein MEK-Inhibitor (U0126, inhibitorischer Effekt auf die ERK1/2 Signalkaskade) in das *in vivo* Modell injiziert wurde. Kwiecińska et al. (2005) konnten zeigen, dass ein MEK Inhibitor *in vitro* bei C2C12 Zellen eine Minderung der Entwicklungsfähigkeit der Myoblasten bewirkt und somit auch einen hemmenden Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Muskelvorläuferzellen hat.

1.5.3. p38-Signalkaskade

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, sind die IGFs an der Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase und der MAP-Kinase über einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor in unterschiedlichen Zellen, unter anderem auch den Muskelzellen, beteiligt (Moxham et al., 1996; Tsakiridis et al., 1996). Eine dieser MAPK ist die von Insulin induzierte p38-MAPK. Weiterhin wird p38, durch Behandlung mit auf die Zelle einwirkenden Stressfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen, aktiviert (Raingeaud et al., 1995). Die intrazellulären Aktivatoren von p38 sind MKK3 und MKK6, ebenfalls MAP-Kinasen (Han et al., 1996). Zetser et al. (1999) konnten zeigen, dass der p38-Signalweg zum einen eine wichtige Rolle bei der *in vitro* Differenzierung von Myoblasten spielt, und zum anderen diese Rolle wahrscheinlich über eine Interaktion mit dem MEF2C Transkriptionsfaktor vermittelt.

1.5.4. JNK-Signalkaskade

Es wurde bereits in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt, dass Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs), wie ERK1/2 und p38, eine wichtige Rolle bei der Regulation der Myogenese spielen. Der Einfluss einer eben solchen MAPK, nämlich der „c-Jun NH(2)-terminal protein kinase“ (JNK), auf die Skelettmuskeldifferenzierung ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch erwiesen, dass die JNKs *in vitro* ebenfalls einen regulativen Einfluss auf die Myogenese haben (Khurana und Dey, 2004). JNK wird durch andere Kinasen, wie JNKK oder SEK-1/-2, phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die Aktivierung der JNK-Kinase resultiert aus unterschiedlichen Einflüssen, wie beispielsweise umweltbedingtem Zellstress, sowie Zytokine und Apoptose-induzierenden Stoffen (Ichijo, 1999). Wie auch die anderen MAPKs, haben die JNKs mehrere verschiedene Ziele in der Zelle. Sie phosphorylieren c-Jun, ATF-2, Elk-1, p53, DPC4, NFAT4 und verstärken deren Transkription (Liu et al., 1996; Cavigeli et al., 1995; Fuchs et al., 1998). Eine Überaktivierung der JNKs und eine daraus resultierende Phosphorylierung ihrer Substrate c-Jun und p53 wird häufig mit dem programmierten Zelltod oder Zellstress in Verbindung gebracht (Mc Gee et al., 2002; Zacchi et al., 2002). Neuere Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, dass die JNK-Kinase außerdem eine bedeutende Rolle bei einer Reihe verschiedener zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel dem Überleben und der Proliferation von Zellen, spielt (Davis, 2000; Du et al., 2004). Andere Studien zeigten eine Beteiligung der JNK-Kinase an der Tumorentwicklung (Potapova et al., 2000). Khurana und Dey (2004) konnten zeigen, dass die Aktivierung von JNK essentiell für die Differenzierung der Skelettmuskulatur ist und außerdem das Überleben der Muskelvorläuferzellen beeinflusst. Dies war der Anlass, mit Hilfe des JNK-Inhibitors, die *in vitro* an L6E9 Zelllinien erzielten Ergebnisse auch *in vivo* zu überprüfen. Dieser JNK-Inhibitor besteht aus zellpermeablen, biologisch aktiven Peptiden, die die Aktivierungsdomäne von JNK blockieren und außerdem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun verhindern.

1.5.5. PKC - MARCKS - Signalkaskade

Die Proteinkinase C (PKC) ist ein Enzym der Familie der Proteinkinasen. Durch eine Übertragung von Phosphat auf Serin- oder Threoningruppen steuert sie die Aktivität nachgeordneter Enzyme oder Faktoren. Auf Grund dieser regulatorischen Funktion nimmt die Proteinkinase C eine zentrale Rolle bei der zellulären Signalweiterleitung ein (Löffler et al.,

2003). Man weiß, dass die PKC eine bedeutende Rolle in der post-translationalen Modifizierung von muskelspezifischen Genen spielt (Li et al., 1992). Trotzdem ist der genaue Wirkungsmechanismus von PKC in der Myogenese bis heute nicht vollständig geklärt. Sicher ist, dass die PKC über verschiedene Mechanismen die Signaltransduktion regulieren kann, dadurch den Zellzyklus und das Überleben der Zellen beeinflusst (Howe et al., 1998) und außerdem eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung spielt (Clark und Brugge, 1995). Dedieu et al. (2003) beschreiben einen möglichen Signalweg, der über PKC vermittelt wird und speziell die Migration der Muskelvorläuferzellen beeinflusst. In diesem Signalweg spielt MARCKS (Myristoylated Alanine Rich C Kinase Substrate) eine entscheidende Rolle. MARCKS ist ein Protein, welches je nach Phosphorylierungszustand entweder in der Plasmamembran oder im Zytosol lokalisiert ist (Swierczynski et al., 1995). Erfolgt eine Phosphorylierung durch PKC, führt dies zur Translokation von MARCKS von der Zellmembran ins Zytosol (Vaaraniemi et al., 1999; Kim et al., 2000). Eine Inhibierung der Migration der Muskelvorläuferzellen ist wahrscheinlich auf eine Ansammlung von MARCKS an der Plasmamembran zurückzuführen. Demzufolge ist PKC in der Lage die Migration der Muskelvorläuferzellen zu fördern, indem es MARCKS phosphoryliert, eine Translokation von der Membran in das Zytosol herbeiführt und folglich die Konzentration von MARCKS an der Plasmamembran erniedrigt. Dieser Idee folgend wurden nun C2C12 Zellen mit einem potenten Protein Kinase C Aktivator, nämlich PMA, inkubiert (Aragon et al., 2002; Besson et al., 2001; Bonavita et al., 2003). Wie erwartet, führte der PKC-Aktivator zu einem starken Anstieg der Migrationsfähigkeit der Zellen (Dedieu et al., 2003). In dieser Arbeit wurde nun versucht den beobachteten Effekt auf das *in vivo* Modell zu übertragen, indem dort ein PKC-Inhibitor injiziert wurde, der erwartungsgemäß einen inhibitorischen Effekt auf die Migration der Muskelvorläuferzellen haben sollte.

1.5.6. Interaktion zwischen PI3 und p38-Kinase

Die bisher vorgestellten, in die Regulation der Myogenese eingreifenden Signalkaskaden dürfen nicht als streng lineare und unabhängig voneinander agierende Abläufe verstanden werden, sondern müssen vielmehr als ein zusammengehörendes Signalprogramm betrachtet werden, bei dem es zu Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Signalkaskaden kommen kann. Um eine solche Wechselwirkung exemplarisch vorzustellen, dient das Zusammenspiel der p38 und PI3-Kinase (siehe Abbildung 1.4.).

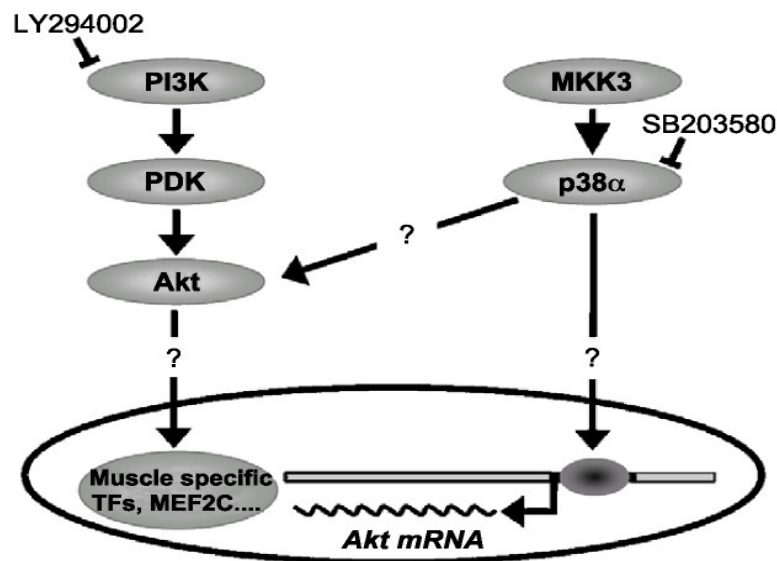


Abbildung 1.4.: Wechselwirkungen zwischen der PI3K-Kaskade und der p38 Signalkaskade. Sie zeigt, dass p38 sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptionsebene auf die PI3K-Kaskade Einfluss nehmen kann. Darstellung aus Cabane et al., 2004.

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, spielen sowohl der Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signalweg als auch der p38 Signalweg eine bedeutende Rolle in der Myogenese. Cabane et al. (2004) konnten mit Hilfe von Zellkulturexperimenten mit C2C12-Zellen zeigen, dass p38 die AKT-Kaskade während der myogenen Differenzierung einerseits auf Proteinebene, andererseits auch auf der Transkriptionsebene beeinflussen kann. Eine Aktivierung oder Inhibierung des MKK3/p38 Signalwegs beeinflusst den Aktivierungszustand von AKT, wohingegen eine Aktivierung oder Inhibierung der PI3/AKT-Kaskade keinen Einfluss auf den Aktivitätszustand der p38-Kaskade hat.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit ist durch folgende zentrale Frage bestimmt: können Signalkaskaden von denen bekannt ist, dass sie *in vitro* an unterschiedlichen Stellen an der Myogenese beteiligt sind, diesen Einfluss auf die Myogenese auch *in vivo* ausüben? Um diese Frage zu beantworten, wurden spezifische Inhibitoren der ausgewählten Signaltransduktionswege verwendet. Es handelte sich hierbei um fünf verschiedene Inhibitoren (PKC-, JNK-, AKT-, MEK- und PI3 - K Inhibitor), die alle an den entsprechenden Zielproteinen eingreifen. Als *in vivo* Modell diente der Hühnerembryo, in dessen Somiten die entsprechenden Inhibitoren injiziert wurden. Als Ergänzung und Erweiterung dieser Experimente wurden die eben genannten Inhibitoren, mittels eines Boyden Chamber Assay

und C2C12 Zellen, zusätzlich *in vitro* verwendet, um ihren Einfluss auf die Muskelzellwanderung *in vitro* zu untersuchen.

2. Material und Lösungen

2.1. Material

2.1.1. *Gebrauchswaren*

| | |
|--|---|
| Filmmaterial | Polaroid |
| Glaspipetten | Hirschmann Laborgeräte |
| Reaktionsgefäße, Plastikwaren | Greiner Labortechnik GmbH Nunc, Sarstedt |
| Zellkulturschalen (Nunc Surface©) | Nunc, Sarstedt |
| Objektträger, Deckgläser, Glaskapillaren | Science Products GmbH |

2.1.2. *Enzyme*

| | |
|---------------------------------|-----------------------|
| Alkalische Phosphatase | Boehringer (Mannheim) |
| Proteinase K | Boehringer (Mannheim) |
| Restriktionsendonukleasen | Boehringer (Mannheim) |
| RNase A | Boehringer (Mannheim) |
| RNase H | Promega (Heidelberg) |
| RNasin (RNase Inhibitor) | Promega (Heidelberg) |
| T3-RNA-Polymerase | Promega (Heidelberg) |
| T7-RNA-Polymerase | Promega (Heidelberg) |
| Trypsin/EDTA | Gibco BRL |

2.1.3. *Chemikalien*

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Chemikalien und Biochemikalien von den Firmen Sigma, Merck, BD Biosciences, Applichem, Invitrogen, Roth und Biomol in Analysequalität bezogen.

2.1.4. Antikörper

primäre Antikörper

Dig-Antikörper konjugiert mit alkalischer

PhosphataseBoehringer (Mannheim)

2.1.5. Inhibitoren

Protein Kinase C Inhibitor Peptide 19-31..... Calbiochem

Verwendete Konzentration: 0,65 mM

LY 294002 (PI3-Kinase Inhibitor)Promega (Heidelberg)

Verwendete Konzentration: 10 mM

AKT Inhibitor IV Calbiochem

Verwendete Konzentration: 8,1 mM

MEK Inhibitor U0126 Promega (Heidelberg)

Verwendete Konzentration: 10 mM

JNK Inhibitor I, (L)-Form, Cell Permeable... Calbiochem

Verwendete Konzentration: 0,5 mM

2.1.6. Befruchtete Hühnereier

Virusfreie, befruchtete SPF-Hühnereier wurden von der Firma Lohmann bezogen.

2.1.7. DNS-Längenstandard

λ -Marker: λ -DNA wurde mit EcoRI und Hind III verdaut.

2.1.8. Zelllinien

C2C12 Maus Myoblasten..... (Yaffe and Saxel 1977) CRL-1772

Die C2C12-Linie wurde erstmals 1977 vorgestellt. Sie ist durch Kultivierung von Skelettmuskelvorläuferzellen, welche aus der Maus isoliert worden sind, entstanden. C2C12-Zellen besitzen nach Aussäen in eine Kulturschale und Kultivierung in Anwesenheit von fötalem Kälberserum (FCS) einen myoblastischen Phänotyp. C2C12-Zellen exprimieren den muskelspezifischen Transkriptions- und Differenzierungsfaktor MyoD. Durch den Entzug

von Wachstumsfaktoren wird ein zweites Gen, Myogenin, aktiviert. Diese beiden Genprodukte leiten dann konzentriert die Prozesse der Myogenese und der Myotubenbildung ein.

2.1.9. Verwendete Sonden für whole mount in situ Hybridisierung

Einzelsträngige RNA-Proben wurden mittels RNA-Polymerasen synthetisiert. Hierfür wurde die DNA der Probe in ein Plasmid kloniert. Dadurch wird das Zielgen von zwei verschiedenen RNA-Polymerase Initiationsstellen flankiert. Dies ermöglicht die Synthese eines sense-Stranges (Kontrolle) oder eines Antisense-Stranges (Probe). Das Plasmid wird hierzu mit dem entsprechendem Restriktionsenzym linearisiert, so dass Plasmidsequenzen, die einen hohen Hintergrund verursachen, nicht transkribiert werden. Die unten aufgeführten cDNA-Subklone dienen als Matrize zur Herstellung von antisense-RNA-Proben mittels in vitro Transkription.

- Hühnchen Lbx1 (cLbx1)

800 bp in pBluescript KS II +

Antisense-Probe: Linearisierung mit Sall, Transkription mit T7 RNA-Polymerase

- Hühnchen Pax 3

600 bp in pBluescript KS II +

Antisense-Probe: Linearisierung mit Bam H I, Transkription mit T3 RNA-Polymerase

2.2. Lösungen und Puffer

2.2.1. Lösungen und Medien für molekularbiologische Methoden

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q; Millipore) angesetzt. Wenn nicht anders erwähnt, wurde der pH-Wert mit NaOH oder HCl eingestellt.

Für die erforderlichen DNA-Präparationen haben wir die in Tabelle 2.1 aufgeführten Lösungen verwendet.

Tabelle 2.1: Lösungen für DNA-Präparation

| | |
|----------|--|
| Lösung A | 50 mM Glucose 25 mM Tris pH 8.0 10 mM EDTA |
| Lösung B | 0,2 N NaOH 1% SDS |
| Lösung C | 3 M Kalium Acetat 1,8 M Essigsäure |

Für die im Gliederungspunkt 3 aufgeführten mikrobiologischen Methoden sind die aus Tabelle 2.2 zu entnehmenden Lösungen benötigt worden.

Tabelle 2.2: Lösungen für mikrobiologische Methoden

| | |
|-----------------------|---|
| Ethidiumbromid Lösung | 1% (10 mg/ml) Stammlösung; Arbeitslösung 0,01% in H ₂ O |
| TAE-Puffer 50x | 2 M Tris-Base 1 M CH ₃ COOH 0,1 M EDTA, mit Essigsäure auf pH 8,3 eingestellt |
| TAE - Puffer 10x | 10 mM Tris - HCl 0,1 mM EDTA |
| PBS 10x | 1,5 M NaCl 0,03 M KCl 0,08 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,01 M KH ₂ PO ₄ pH 7,5 |
| DNA - Ladepuffer | 12% Ficoll 4000 60 mM Na ₂ EDTA, pH 8,0 0,6% SDS 0,15% Bromphenolblau 0,15% Xylencyanol |

2.2.2. Lösungen für whole mount in situ Hybridisierung

Die während der Transkription und Hybridisierung verwendeten Lösungsmittel waren absolut RNase-frei. Die Lösungen wurden mit 0,01 % Diehtylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und anschließend zweimal autoklaviert. DEPC wirkt als Radikalbildner und inaktiviert die meisten enzymatischen Proteine und somit auch RNasen. Um eine vollständige Auflösung des PFA-Pulvers zu erzielen, wurde die Lösung auf 55 °C erwärmt und außerdem einige Tropfen NaOH hinzugegeben. Der pH-Wert wurde anschließend mit HCl auf 6-7 eingestellt und das PFA aliquotiert bei -20 °C gelagert. Der Tabelle 2.3 sind die für die whole mount in situ Hybridisierung verwendeten Lösungen zu entnehmen.

Tabelle 2.3: Lösungen für whole mount in situ Hybridisierung

| | |
|-----------------------|---|
| Dig - Mix | 10 mM ATP 6,5 mM UTP 10 mM GTP 10 mM CTP 3,5 mM Dig-II-UTP in TE pH 7,5 |
| PBT | 1 x PBS mit 0,1% Tween 20 versetzt |
| Hefe-RNA | 10 mg/ml in DEPC-H ₂ O |
| PBT/Glycin | PBT + 2 mg/ml Glycin |
| Proteinase-K Puffer | 10 ml Tris pH 7,0 1 ml 0,5 M EDTA ad 500 ml H ₂ O |
| Proteinase K | 20 µg/ml in Proteinase K Puffer |
| SSC/Formamid/Tween | 5 ml 20 x SSC 25 ml Formamid 50 µl Tween 20 ad 500 ml DEPC-H ₂ O |
| Hybridisierungspuffer | 25 ml Formamid 12,5 ml 20 x SSC (pH 4,5) 25 µl Heparin 50 µl Tween 20 12,5 ml DEPC-H ₂ O |

| | |
|-----------------------------------|--|
| RIPA | <p>250 µl 20% SDS 3 ml 5 M NaCl 1 ml NP40 5 ml 10% Na-Deoxycholat 200 µl 0,5M EDTA 5 ml 1 M Tris, pH 8,0 ad 100 ml DEPC-H₂O</p> |
| 20 x SSC | <p>175,3 g NaCl 88,2 g Na-Citrat ad 1 l DEPC-H₂O, pH 7,0</p> |
| 10 x TBST | <p>80 g NaCl 2 g KCl 250 ml Tris (1 M, pH 7,5) 100 ml Tween 20 ad 1 l H₂O</p> |
| RNase Puffer | <p>1 ml NaCl 100 µl 1 M Tris, pH 7,5 10 µl Tween 20 8,89 ml H₂O</p> |
| RNase A | <p>Sigma R-4875 Konzentration 10 mg/ml, in Natriumacetat lösen (pH 5,2), 15 Minuten auf 100 °C erhitzen</p> |
| MABT | <p>11,6 g Maleinsäure 8,8 g NaCl 1 ml Tween 20 ad 1 l H₂O pH 7,5</p> |
| Blockierungs- Stammlösung | <p>10% (w/v) Blocking Reagenz (Boehringer, Ingelheim) in MABT</p> |
| TBST/Levamisol | <p>2 mM Levamisol in TBST</p> |
| Alkalischer Phosphatase Puffer | <p>1 ml 5 M NaCl 2,5 ml 1 M MgCl₂ 50 µl Tween 20</p> |

| | |
|-------------|--|
| | 5 ml 1 M Tris, pH 9,5 2 mM Levamisol ad 50 ml H ₂ O |
| Färbelösung | Boehringer BM purple AP Substrat 2 mM Levamisol 0,1% Tween 20 zentrifugieren und Pellet verwerfen |
| Heparin | 100 mg/ml in 4 x DEPC SSC |
| PBS | 30 ml NaCl (5 M) 15 ml Na-Ph Puffer (1 M; pH 7,3) ad 1 l mit DEPC-Wasser |
| 4%PFA | 40 g Paraformaldehyd ad 1 l 1 x PBS |

2.2.3. Lösungen und Medien für die Zellkultur

Zur Herstellung der Zellkulturmedien wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) der Firma Gibco BRL verwendet. Für die Kultivierung der C2C12 Zellen unter Wachstumsbedingungen wurde 20% FCS (Fötale Kälberserum) verwendet. Das Differenzierungsmedium enthielt 5% Pferdeserum (Invitrogen) anstelle von 20% FCS. Sowohl dem Wachstumsmedium als auch dem Differenzierungsmedium wurden 20 mmol/l-Glutamine, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin zugesetzt. Die verwendeten Lösungen für die Zellkultur sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Lösungen und Medien für die Zellkultur

| | |
|-------------------|--------------------------------|
| Einfrüermedium | 20% FCS 10% DMSO in DMEM |
| Trypsin/EDTA 10 x | 0,5%/0,2% in 10 x PBS |

2.2.4. Sonstige Lösungen

Für die Durchführung der verschiedenen mikrobiologischen Methoden wurden zusätzlich zu den bereits aufgelisteten Materialien und Lösungen folgende in Tabelle 2.5 aufgeführten Lösungen eingesetzt.

Tabelle 2.5: Sonstige Lösungen

| | |
|---------------------|---|
| Ringerlösung | 7,2 g NaCl 0,36 g KCl 0,23 g CaCl ₂ ad 1 l H ₂ O, pH 7,2 |
| Xylol/Ethanol | 50% Ethanol 50% Xylol |
| Eosin-Arbeitslösung | 5 ml Eosin 250 ml H ₂ O zwei Tropfen Essigsäure |
| Entellan | Firma Merck |

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wurden nach „Molecular Cloning“ (Sambrook, J. und Russel, D., 1998) oder „Short Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1992) durchgeführt.

3.1.1. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenanalyse von Nukleinsäuremolekülen wurden 1%-ige Agarosegele hergestellt. Dazu wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE aufgekocht, nach Abkühlen auf etwa 50°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,04 µg/ml) versetzt und in einer Plexiglasform zu einem Gel gegossen. Durch Einhängen eines entsprechenden Plexiglaskamms wurden Ladetaschen der gewünschten Größe an einem Ende des Gels eingefügt. Das so präparierte Gel wurde in eine Gelelektrophoresekammer gelegt, welche mit 1 x TAE gefüllt war. Anschließend wurde die zu analysierende DNS mit Ladepuffer versetzt und auf das Gel geladen.

Das Anlegen einer Spannung von 50-100 V dient der Auftrennung der DNS nach ihrer Größe. Zu Dokumentationszwecken wurden die Agarosegele auf einen UV-Durchlichttisch gelegt und mit einer Polaroidkamera abfotografiert.

3.1.2. Ethanolfällung von DNA

Zur Reinigung der DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol (100%) zugesetzt. Anschließend inkubiert man das Gemisch entweder 20 Minuten bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert die präzipitierte DNA. Das DNA-Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung bei RT wurde die DNA in einer entsprechenden Menge H₂O gelöst.

3.1.3. Reinigung von Nukleinsäurelösungen

Um Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroformextraktion durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform gründlich vermischt und zehn Minuten bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die dabei entstehende obere wässrige Phase, in der die DNA

enthalten ist, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, und zur Präzipitation der Nukleinsäuren eine Ethanol-fällung durchgeführt.

3.1.4. Verdau von Vektoren mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche die Eigenschaft besitzen, DNS an spezifischen palindromischen Sequenzen zu schneiden. Diese Eigenschaft kann man zur Analyse und Klonierung von DNA nutzen. Für die Klonierung linearisiert man Vektoren und ligiert in diese bestimmte DNA-Fragmente, die man zuvor ausgeschnitten oder amplifiziert hat. Ein typischer Restriktionsverdau im Verlauf dieser Arbeit sah folgendermaßen aus:

Tabelle 3.1: Restriktionsverdau

| x µl | DNA |
|-------------|-----------------|
| 1 µl | Enzym (10 U/µl) |
| 2 µl | 10 x Puffer |
| 2 µl | BSA (10 mg/ml) |
| ad 20 µl | Aqua bidest |

Bei präparativen Ansätzen (DNA-Menge $10 > \mu\text{g}$) wurde ein Ansatzvolumen von 50 µl gewählt.

3.2. Methoden der Zellkultur

Isoliert man aus den Geweben von Pflanzen und Tieren einzelne Zellen, so lassen sich diese auch außerhalb ihres Zellverbandes unter geeigneten Bedingungen *in vitro* kultivieren. Viele *in vitro* kultivierte Säugetierzellen wachsen nicht in Suspension, sondern adhärieren auf Kulturgefäßen, die mit einem geeigneten Nährmedium beschichtet sind. Hierbei sind die Zellen jedoch nicht unbegrenzt wachstums- und teilungsfähig. Bei unmittelbarem Kontakt der Zellen zueinander stellt sich eine Wachstumshemmung (Kontaktinhibition) ein. Dies ist der Grund, warum einige Zelllinien so genannte „Monolayer“ ausbilden, also einfache Zellschichten. Konfluente Zellen anderer Zelllinien, wie auch die der hier verwendeten C2C12 Zelllinie, differenzieren, wenn sie zu dicht gewachsen sind. Für die fortlaufende Subkultivierung der C2C12 Muskelzelllinie muss der Anteil der teilungsfähigen Myoblasten in der Kultur aufrechterhalten werden (Yaffe und Saxel, 1977). Dazu wurden die Zellen vor

einsetzender Differenzierung, dass heißt unmittelbar vor Erreichen der Konfluenz, passagiert (Passagierung, siehe 3.2.2).

3.2.1. Zellkultivierung

Die Kultivierung der C2C12 Zellen erfolgte in Kulturmedium mit 20% FCS. Die Anzucht der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 10% CO₂-Gehalt in wasserdampfgesättigter Luft. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt.

3.2.2. Passagierung

Für die Zellpassagierung wurde zunächst aus dem jeweiligen Zellkulturgefäß das verbrauchte Medium abgenommen und die auf dem Gefäßboden adhärenen Zellen dann, in ihrem noch subkonfluenten Stadium, zweimal fünf Minuten mit 1 x PBS gewaschen. Dies ermöglicht es abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Reste verbrauchten Mediums zu entfernen. Danach erfolgt die proteolytische Ablösung (Trypsinisierung) der Zellen vom Gefäßboden durch Behandlung mit Trypsin/EDTA (1,5 ml Trypsin/EDTA pro 90 mm Schale). Desweiteren wurde die Ablösung der Zellen durch kurzes, kräftiges Schlagen an die Seitenwände des Gefäßes unterstützt. Die Ablösung der Zellen wurde im Mikroskop verfolgt. Die enzymatische Reaktion wurde mit Kulturmedium abgestoppt und die abgelösten Zellen wurden 5 min. mit 1000 rpm bei RT pelletiert. Nach Aufnahme in 1-2 ml Medium und mehrmaligem vorsichtigen auf- und abpipettieren der Zellen, um diese zu vereinzeln, erfolgte die Auszählung mit der Neubauer Zählkammer.

3.2.3. Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen, wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben, zunächst gewaschen, vom Kulturgefäß abgelöst, resuspendiert und vereinzelt. Gezählt wurden die Einzelzellen in einem definierten Volumen, vorgegeben durch die Neubauer Zählkammer. Die Kammer besteht aus 9 Großquadraten mit je 1mm Seitenlänge, vier davon erhalten noch zusätzlich 16 Kleinquadrate mit einer Seitenlänge von 0,25 mm. Das Volumen über einem Großquadrat mit einer Fläche von 1 mm² beträgt demnach 0,1 mm³ beziehungsweise 0,1 µl. Die Zellzahl in einem bestimmten Volumen lässt sich somit berechnen aus:

$$N_{\text{gesamt}} = N_{\text{GQ}} \times V \times 10000$$

N_{GQ} : Zellzahl über einem Großquadrat

V: Gesamtvolumen der Suspension (ml)

N_{gesamt} : Gesamtzellzahl im Volumen V

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Für jede Zellzahlbestimmung wurde die Zellzahlen von jeweils 16 Kleinquadraten summiert, um die Zellzahl über einem Großquadrat zu erhalten. Mit dem Mittelwert der Zellzahlen von zwei Großquadraten wurde die Gesamtzellzahl errechnet.

3.2.4. Kryokonservierung von Säugerzellen

Die Zellen wurden trypsinisiert, wie bereits beschrieben, und das Zellpellet in Einfriermedium aufgenommen, so dass eine Zelldichte von ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium gegeben war. Die Kryokonservierung dient dazu, Zellen, die momentan nicht benötigt werden, zu lagern. Gelagert wurden die Zellen in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen (Nunc), danach sofort in Eis überführt und in einer Styroporbox über Nacht auf -80°C abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

Bei entsprechendem Bedarf kann man dann die Zellen in einem 37°C Wasserbad wieder auftauen. Nach Überführung in Wachstumsmedium wurden die Zellen auf 90 mm Schalen kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

3.2.5. Ernte von Zellen

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen, wie unter 3.2.2. beschrieben, zweimal mit 1 x PBS gewaschen und trypsinisiert. Je nach Bedarf stand das Zellpellet entweder direkt für die Weiterbearbeitung zur Verfügung oder konnte bei -20°C gelagert werden.

3.2.6. Chemotaxisanalyse mittels Boyden Chamber Assay

Zur Überprüfung der Wanderung von C2C12 Zellen *in vitro*, unter Einfluss der schon *in vivo* im Hühnchenmodell eingesetzten Inhibitoren, wurde der Boyden Chamber Assay gewählt (siehe Abbildung 3.1.). Dies ist eine 48-microwell chemotaxis chamber (Neuro Probe, Cabin

John, MD) mit einer Polycarbonatmembran von 8 μm Porengröße. Nach gründlicher Desinfektion der verwendeten Materialien wurden die Versuche folgendermaßen durchgeführt. Die Kammer besteht aus zwei Teilen, die sich getrennt voneinander bearbeiten lassen und beide jeweils 48 Wells besitzen. Zuerst wurde der untere Teil der Kammer mit ca. 30 μl vorgewärmten Wachstumsmedium pro Well gefüllt, so dass sich ein luftblasenfreier, leicht positiver Azinus bildet. Anschließend wurde der obere Teil der Kammer pro Well mit 50 μl Zellsuspension von C2C12-Zellen und der entsprechend berechneten Inhibitorenmenge gefüllt. Dazu wurde eine Konzentration von 8×10^4 Zellen/ml Wachstumsmedium eingestellt. Nun wurde mit einer Pinzette vorsichtig die Membran auf die untere Kammer gelegt, diese mit einer Silikondichtung abgedeckt und die obere Kammer aufgeschraubt. Nach sechs Stunden Laufzeit der Zellen in der Kammer im Inkubator bei 37°C und feuchter 10% CO₂ Atmosphäre, wurde das Experiment beendet und die Auswertung vorgenommen. Um den Versuch unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten zu können, müssen die Zellen, nach mehrmaligem beidseitigem Waschen der Membran mit 1 x PBS (dem Herstellerprotokoll folgend) fixiert werden. Dies geschieht bei Raumtemperatur durch zehnmünütige Inkubation in PBS mit 4% Paraformaldehyd. Anschließend kann nun die Färbung der Zellkerne auf der Unterseite der Membran mit Hoechst 33258 (Molecular Probes) erfolgen. Die Auswertung der Zellzahl erfolgte, nach Aufnahme an Fluoreszenzmikroskop, mit der Flächenanalyse Software Scion (Fläche der Zellen in Beziehung zur Gesamtfläche der Membran). Die relative Migrationsfähigkeit bildet sich aus dem Flächenverhältnis der Zellen mit und ohne Inhibitor. Bei der Versuchsanordnung wurden die insgesamt 48 Wells in vier Fraktionen mit jeweils zwölf Wells aufgeteilt (1 x Nullprobe, 3 x Inhibitor) und diese Versuchsbedingungen je Inhibitor vier mal wiederholt, so dass schließlich jeder Inhibitor insgesamt in mindestens 48 Wells getestet wurde.

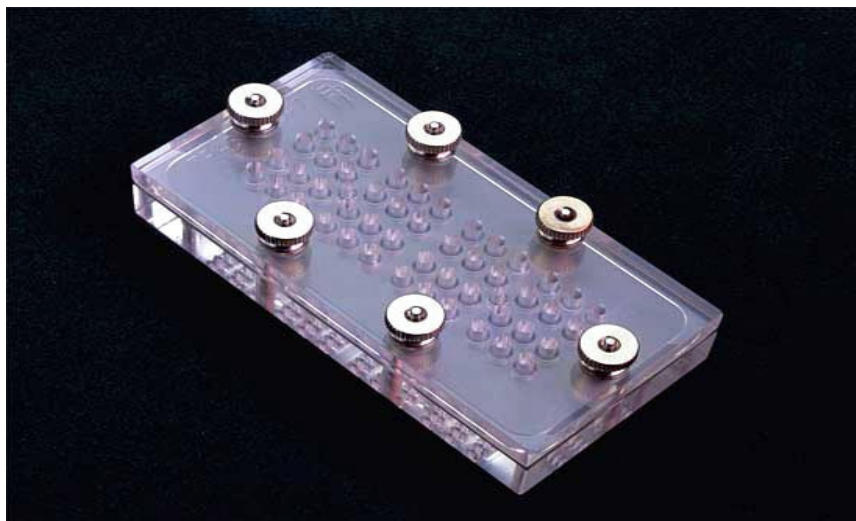


Abbildung 3.1.: „Boyden Chamber“

3.3. Whole mount in situ Hybridisierung

Die Detektion spezifischer Nukleinsäuresequenzen auf der Ebene von RNA, viraler DNA oder chromosomaler DNA in Zellen, Geweben oder ganzen Organismen durch in situ Hybridisierung stellt eine wichtige Methode in vielen Bereichen biologischer und medizinischer Fragestellungen dar. Um die Funktion und Regulation bestimmter Gene aufklären zu können, ist die Analyse der zeitlichen und räumlichen Expression von großem Interesse. Hierbei stellt die in situ Hybridisierung eine eindrucksvolle und aussagekräftige Methode dar. Grundsätzlich ermöglicht diese Methode, Transkripte im gesamten Embryo („Whole mount“) durch Hybridisierung mit einer markierten komplementären RNA-Sonde nachzuweisen. Die markierte Sonde kann mittels spezifischer, enzymgekoppelter Antikörper nach Umsetzung eines Farbsubstrates detektiert werden.

Die Embryonen wurden über Nacht in 4% PFA fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Methanol-Reihe auf Eis dehydriert. In diesem Zustand konnten sie bei -20°C gelagert werden und je nach Bedarf rehydriert und dann weiter verwendet werden.

3.3.1. Herstellung der Probe

- Mit einem spezifischen Enzym wurde der DNS-Vektor zur Herstellung einer Matrize für die RNS-Polymerase linearisiert.
- Die Schnittstellen für die Linearisierung wurden so gewählt, dass Transkripte mit definierter Länge entstanden.
- Anschließend wurde die DNS mit einem Chloroform/Phenol-Gemisch extrahiert und damit verunreinigende Proteine entfernt.
- Mittels Gelelektrophorese wurde die Linearisierung überprüft und die Konzentration der DNS-Matrize bestimmt.

Der Transkriptionsansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Tabelle 3.2: Transkriptionsansatz Teil 1

| | |
|----------|---|
| X µl | Matrizen DNA (ca. 10 µg) |
| 4 µl | 5 x Transkriptionspuffer |
| 2 µl | Dig-Mix (enthält Digoxigenin markiertes UTP) |
| 2 µl | DTT (0,1 M) |
| 1 µl | RNasin (40 U/µl) |
| 1 µl | RNA - Polymerase (20 U/µl) |
| Ad 20 µl | Aqua bidest |

Der Ansatz wurde zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1 µl Probe für eine spätere Kontrolle mittels Gelelektrophorese entnommen und die DNA-Matrize durch Zugabe von 2 µl DNase bei 37°C 15 Minuten lang verdaut.

Tabelle 3.3: Transkriptionsansatz Teil 2

| | |
|--------|---------------------------|
| 20 µl | Reaktionsansatz (Fällung) |
| 1 µl | t-RNA (10 mg/ml) |
| 100 µl | H ₂ O-DEPC |
| 33 µl | Ammoniumacetat (7,5 M) |
| 300 µl | 100 % Ethanol |

Dieses Gemisch wurde kurz gevortext und 30 Minuten bei -80°C inkubiert.

Danach wurde die Suspension zehn Minuten bei 4°C mit 13000 Upm zentrifugiert, anschließend das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und fünf Minuten getrocknet. Die RNS wurde in 100 µl Aqua bidest gelöst und mit 1 µl RNasin versetzt. Die vor dem DNase-Verdau entnommene Probe und 1 µl resuspendierte RNA wurden auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen, um mittels Gelelektrophorese die Konzentration und Integrität der RNS zu bestimmen.

3.3.2. *Fixierung, Vorbehandlung und Hybridisierung der Embryonen*

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Waschschrirte bei Raumtemperatur für fünf Minuten durchgeführt.

Vorbehandlung und Fixierung der Embryonen

Die gängigste Fixierung, bei der die Morphologie gut erhalten bleibt, ist die mit Paraformaldehyd (4%). Sie gewährleistet eine gute Erreichbarkeit und/oder Retention zellulärer RNA.

- Die Embryonen wurden aus dem Ei herauspräpariert und die den Embryo umgebenden Membranen entfernt.
- Die Embryonen wurden in Petrischalen mehrmals mit 1 x PBS gewaschen.
- Über Nacht konnte man nun die Embryonen in 4% PFA/PBS bei 4°C (pH 6-7) fixieren.
- Zur vollständigen Entfernung des Paraformaldehyds wurden die Embryonen zwei mal 30 Minuten bei 4° C in 1 x PBS gewaschen.
- Um die Embryonen über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurden sie durch eine Methanolreihe auf Eis dehydriert:
 1. einmal zehn Minuten waschen mit 25% Methanol/PBS
 2. einmal zehn Minuten waschen mit 50% Methanol/PBS
 3. einmal zehn Minuten waschen mit 75% Methanol/PBS
 4. zweimal je zehn Minuten waschen mit 100% Methanol
- In 100% Methanol konnten die Embryonen nun mehrere Monate bei -20°C gelagert werden.

Hybridisierung

- Vor der Hybridisierung müssen die Embryonen auf Eis rehydriert werden:
 1. einmal zehn Minuten waschen mit 75% Methanol/PBS
 2. einmal zehn Minuten waschen mit 50% Methanol/PBS
 3. einmal zehn Minuten waschen mit 25% Methanol/PBS
- Embryonen zwei mal zehn Minuten mit PBT auf Eis waschen.

Die Behandlung mit Wasserstoffperoxid unterdrückt eine unspezifische Färbung durch die Inaktivierung endogener Phosphatasen. Zusätzlich dient es der Bleichung pigmentierter Strukturen und erleichtert dadurch die Identifizierung von Signalen:

- Mit 6% Wasserstoffperoxid in PBT eine Stunde auf Eis waschen.
- Dreimal zehn Minuten mit PBT waschen.

Durch Inkubation mit Proteinase K wird die Erreichbarkeit der Ziel RNA durch die Probe erhöht. Dies ist ein kritischer Schritt, bei der die Inkubationszeit individuell an die Größe der Embryonen angepasst sein sollte. Nach der Proteinase K-Behandlung ist eine Nachfixierung der Embryonen erforderlich, da sie sonst zerfallen.

- Proteinase K-Verdau: 10 µg/ml Proteinase K in Proteinase K Puffer bei Raumtemperatur (die Inkubationszeit beim hier vorliegenden Embryonalstadium E12.5 beträgt fünf Minuten).
- Zum Abstoppen der Reaktion wurde zwei mal fünf Minuten mit 2 mg/ml Glycin in PBT gewaschen.
- Zweimal fünf Minuten waschen mit 1 x PBT.
- Dreimal fünf Minuten waschen mit RIPA Puffer.
- Dreimal fünf Minuten waschen mit 1 x PBT.
- Das Gewebe wird nun in 0,2% Glutaraldehyd in 4%-igem PFA/PBT 20 Minuten fixiert.
- Dreimal fünf Minuten mit PBT waschen.

Die Hybridisierung wird bei 65°C durchgeführt. Diese hohe Temperatur vermindert die unspezifische Bindung und führt so zu einem niedrigeren Hintergrund und besser auswertbaren Ergebnissen.

- Einmal zehn Minuten mit einem 1:1 Hybridisierungspuffer/PBT-Gemisch bei Raumtemperatur waschen.
- Einmal zehn Minuten mit Hybridisierungspuffer bei Raumtemperatur waschen.
- Die Embryonen wurden nun zur Prähybridisierung eine bis drei Stunden in einer feuchten Kammer bei 65°C inkubiert.
- Zugabe der Sonde und Hybridisierung über Nacht bei 65°C

3.3.3. Waschgänge nach Hybridisierung und Inkubation mit Antikörper

- Zweimal 30 Minuten mit Hybridisierungspuffer bei 65°C waschen.

Nach der Hybridisierung werden die Embryonen mit hoher Stringenz gewaschen und anschließend die Probe, die nicht mit der Ziel RNA hybridisiert hat, durch Ribonuklease Behandlung (RNase) entfernt.

- Einmal fünf Minuten mit Hybridisierungspuffer/RNase Lösung bei Raumtemperatur waschen.
- Zweimal 30 Minuten in RNase Lösung mit 100 µg/ml RNase A bei 37°C waschen.
- Einmal fünf Minuten in 1:1 RNase Lösung/SSC/FA/Tween20 bei Raumtemperatur waschen.
- Anschließend die Embryonen in SSC/FA/Tween20 von Raumtemperatur auf 65°C erhitzen.
- Zweimal fünf Minuten mit SSC/FA/Tween20 bei 65°C waschen.
- Dreimal zehn Minuten mit SSC/FA/Tween20 bei 65°C waschen.
- Einmal 30 Minuten mit SSC/FA/Tween20 bei 65°C waschen.
- Fünfmal eine Stunde mit SSC/FA/Tween20 bei 65°C waschen.
- Danach die Embryonen auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
- Embryonen in 1:1 SSC/FA/Tween20/1 x TBST einmal fünf Minuten waschen.
- Zweimal zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 1 x TBST waschen.
- Zweimal zehn Minuten bei Raumtemperatur mit MABT waschen.
- Einmal eine Stunde in 10% Blockierungslösung in MABT bei Raumtemperatur waschen.

Während des „Blockens“ der Embryonen erfolgte die Inkubation des Anti-Digoxigenin-Antikörpers in einer 1:5000 Verdünnung in 1% Blockierungslösung/MABT bei 4°C. An diesen Anti-Dig-Antikörper ist die alkalische Phosphatase konjugiert, die für die spätere Farbreaktion notwendig ist. In dieser Lösung wurden die Embryonen unter leichtem Schütteln bei 4°C über Nacht inkubiert.

An den folgenden Tagen wurden ungebundene Antikörper durch häufiges Waschen in 1 x TBST mit 2 mM Levamisol entfernt. Der Zusatz von Levamisol dient der Inhibierung von endogenen alkalischen Phosphatasen.

3.3.4. Färbung

Die Embryonen wurden dreimal je 20 Minuten in „Alkalischem Phosphatase Puffer“ und anschließend in der Färbelösung mehrere Stunden bis zu drei Tagen bei Raumtemperatur oder 4°C im Dunkeln gefärbt. Dabei ist es wichtig, die Farbreaktion in bestimmten Zeitintervallen unter dem Mikroskop zu beobachten. Es hat sich nicht bewährt die Reaktion über einen längeren Zeitraum, zum Beispiel über Nacht, ohne Beobachtung durchzuführen, da dabei häufig die unspezifische Bindung und damit der Hintergrund zu groß wird. Aufgrund der Tatsache, dass die alkalische Phosphatase ein sehr stabiles Enzym ist, war es möglich die Embryonen über Nacht bei 4°C zu lagern und dadurch die Färbung zu verlangsamen. Die Farbreaktion wurde dann durch mehrmaliges Waschen mit PBT abgestoppt. Anschließend wurden die Embryonen fotografiert und zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.4. Histologische Techniken

3.4.1. Einbetten und Schneiden der Embryonen

Einbetten der Embryonen

- Zunächst wurden für die Embryonen beschriftete Einbettformen vorbereitet, in die dann Polyfreeze™ gefüllt wurde.
- Das Einfrieren fand auf -80°C kaltem Trockeneis statt.
- Die Embryonen mussten nun, um beim anschließenden Schneiden eine optimale Lage zu haben, möglichst zügig eingebettet werden, da die Polymerisierung des Polyfreeze™ schnell voran schreitet.
- Die Gewebeblöcke konnten in diesem Zustand bei -20°C über einen langen Zeitraum gelagert werden, um dann bei entsprechendem Bedarf weiter verarbeitet zu werden.

Schneiden der Embryonen

- Die Gewebeblöcke wurden in einer Schichtdicke von 10-20 μm an einem Kryostat (Firma: Leica) geschnitten.
- Die Schnitte wurden anschließend auf einen Objektträger gezogen und in einem Objektträgerkasten bei -20°C gelagert.

3.4.2. Eosin-Färbung

Zur Eosin-Übersichtsfärbung wurden die zu färbenden Gewebsdünnschnitte in Glasgondeln gestellt und durchliefen die folgenden Inkubationsschritte:

- Zweimal drei Minuten 1 x PBS.
- Einmal drei Minuten H_2O .
- Einmal eine Minute Eosin-Arbeitslösung.
- Einmal drei Minuten 70% Ethanol.
- Zweimal drei Minuten 100% Ethanol.
- Einmal drei Minuten 100% Ethanol/Xylol.
- Zweimal drei Minuten Xylol, wobei für jede Glasgondel eine frische Xylol-Lösung benötigt wird.

Zum Bedecken wurden die einzelnen Objektträger aus dem Xylol genommen, mit Entellan-Medium versehen, und mit einem zuvor in Xylol geschwenktem Deckgläschen bedeckt. Zum Trocknen wurden sie dann auf einen ebenen Untergrund gelegt.

3.5. Mikromanipulation an Hühnchenembryonen

Das Huhn ist ein wertvolles System für experimental-embryologische Verfahren. Der Hühnerembryo ist vergleichsweise groß und durch die extrauterine Entwicklung leicht zugänglich. So stellt die mikrochirurgische Manipulation am Hühnerembryo eine elegante Methode dar, um *in vivo* die Entwicklung des Embryos zu beeinflussen und zu beobachten.

3.5.1. Bedingungen für das Bebrüten von befruchteten Hühnereiern

Für die Experimente, die an Hühnerembryonen durchgeführt wurden, sind virusfreie SPF-Eier von der Firma Lohmann verwendet worden. Bis zur Inkubation wurden die Eier in einem Kühlschrank bei 14°C gelagert. Die Eier wurden dann in einem Bismark Brüter bei einer Temperatur von 38°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-55% bebrütet. Die Dauer der Bebrütung richtete sich nach dem Stadium, in dem die Experimente durchgeführt werden sollten. Im Hühnchen klassifiziert man das embryonale Entwicklungsstadium nach der Zahl der Somiten (Hamburger und Hamilton, 1992). Durch die Wanderung des Hens'schen Knotens von kranial nach kaudal, entstehen symmetrisch auf beiden Seiten des Neuralrohres die Somiten. Man geht davon aus, dass die Muskelvorläuferzellen, welche am Aufbau der Muskulatur der Vorderextremität, also des Flügels beteiligt sind, während der Stadien 12 bis 14 aus den jeweils kaudal gelegenen Somiten auswandern (Somiten 15-20). Die Hinterextremitäten bilden sich auf Höhe der Somiten 26-32.

Tabelle 3.4: Embryonale Entwicklungsstadien nach Anzahl der Somiten nach Hamburger und Hamilton.

| HH | Anzahl der Somiten | Stunden Inkubation |
|-----------|---------------------------|---------------------------|
| 12 | 16 | 45-49 |
| 13 | 19 | 48-52 |
| 14 | 22 | 50-53 |
| 15 | 24-27 | 50-55 |
| 16 | 26-28 | 51-56 |
| 17 | 29-32 | 52-56 |
| 18 | 30-36 | 65-69 |
| 19 | 37-40 | 68-72 |
| 20 | 40-43 | 70-72 |

In dieser Arbeit lag die Inkubationszeit bei 48-52 Stunden (HH 13), worauf dann die Manipulation am Embryo vorgenommen worden ist.

3.5.2. *Injektion von Signalkaskaden-Inhibitoren in Hühnerembryonen*

Vorbereitung

- Die Eier wurden vorsichtig aus dem Bebrüter genommen und mit dem Stempel nach oben gelagert.
- Am hinteren dicken Ende, an dem sich die Luftblase befindet, wurde das Ei mit einem Perforationsgerät angestochen.
- Anschließend wurden mit einer 5 ml-Kanüle ca. 2-3 ml Eiweiß abgesaugt, um das Flüssigkeitsniveau innerhalb des Eis zu senken und so ein Ankleben der Keimscheibe an der Eischale zu vermeiden.
- Die obere Seite des Eis wurde mit Tesafilm abgeklebt, um dann ein ovales Fenster in die Oberseite zu schneiden.
- Der Embryo wurde mit Ringerlösung benetzt, die Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) enthielt, um eine Bakterieninfektion zu vermeiden.
- Zur Kontrastverstärkung des Embryos wurde in den Eidotter, unter die Keimscheibe des Embryos, mit einer feinen Spritze in Ringer-Lösung verdünnte (1:10) schwarze Tinte (Tusche A, Pelikan) gespritzt.
- Danach konnten die Somiten gezählt werden und das Stadium nach Hamburger-Hamilton bestimmt werden.
- Mit einem dünnen Wolframdraht wurde die Vitellinmembran angeritzt und der Embryo im Bereich der Somiten freigelegt.

Injektion

- Die Injektion erfolgte mit dem Injektionsgerät Transjector 5246 von Eppendorf, bei dem der Druck auf 3500 pi und die Injektionszeit auf zwei Sekunden eingestellt wurden.
- Mit einer 10 µl-Mikroloader-Pipettenspitze konnte die zu injizierende Substanz in die Kapillare eingebracht werden.
- Die Kapillare wurde anschließend in den Mikromanipulator des Injektionsgerätes eingespannt.

- Die Länge der Mikroloader-Pipettenspitze und somit auch ihr Durchmesser wurde durch das Abschneiden mit der Mikroschere bestimmt. Die Tropfenstärke konnte so nur annähernd konstant gehalten werden.
- Konzentration der Inhibitoren (PKC: 0,65 mM, PI3: 10 mM, MEK: 10 mM, AKT: 8,1 mM, JNK: 0,5 mM).
- Im Experiment wurde stets in die linke Somitenreihe des Embryos in die Somiten 16-19 injiziert (Stadium HH 13, Anzahl der Somiten 19, Stunden Inkubation 48-52 Stunden), wobei an der rechten Somitenreihe keine Manipulation vorgenommen wurde. Sie diente somit der Negativkontrolle.



Abbildung 3.2: Mikroinjektion des Inhibitors in die Keimscheibe des Hühnchenembryos

- Um Bakterieninfektionen zu vermeiden und verdunstete Flüssigkeit zu ersetzen wurde der Embryo noch einmal mit Ringerlösung benetzt.
- Um ein Austrocknen des Eis zu verhindern, wurde es mit Tesafilm verschlossen und die Embryonen, nach einer weiteren Inkubationszeit von fünf Tagen, präpariert.

3.6. Sterilisation von Lösungen und Geräten

Sterile Materialien sind eine Grundvoraussetzung für das Arbeiten mit RNA, DNA, Zellkulturen sowie die Durchführung enzymatischer Reaktionen, um eine Kontaminierung mit Mikroorganismen zu verhindern und Reaktionen mit der gewünschten Effizienz durchführen zu können. Glaswaren wurden bei trockener Hitze mit 180°C sterilisiert. Plastikwaren, Lösungen und Medien wurden bei 121°C und einem Druck von 2,2 bar 30 Minuten autoklaviert. Nicht hitzestabile Lösungen wurden durch Filtration mit Zelluloseacetatfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm beziehungsweise 0,45 µm sterilisiert.

4. Ergebnisse

Die Idee, die dieser Arbeit zu Grunde lag, war, den Einfluss fünf verschiedener Signalkaskaden auf die Wanderung von Muskelvorläuferzellen *in vivo* zu untersuchen. Spezifische Inhibitoren dieser Signalkaskaden sind dafür bekannt, dass sie *in vitro* in die Myogenese eingreifen. Genau diese aus den *in vitro* Versuchen gewonnenen Erkenntnisse sollten in dieser Arbeit erstmals am *in vivo* Modell überprüft werden, so dass die spezifische Beobachtung der Migration auch am lebenden Organismus möglich wird. Um diese Erkenntnisse zu erweitern wurden zum einen *in vivo* Experimente am Hühnchenembryo (mikrochirurgische Injektion der Inhibitoren in die Somiten 16-19 im Stadium HH 13, Anzahl der Somiten 19, Stunden Inkubation 48-52) durchgeführt und zum anderen, anhand von Zellkulturexperimenten mittels Boyden Chamber Assay, Versuche zur Inhibition der Migration von Muskelvorläuferzellen *in vitro* angewandt.

4.1. *In vivo* Injektion der Signalkaskaden-Inhibitoren

Um den Effekt der Injektion der Signalkaskaden-Inhibitoren in die Somiten 16-19 zu analysieren, wurden Whole-mount-in situ Hybridisierungen durchgeführt. Hierbei sollte untersucht werden, ob die gerichtete Migration der Muskelvorläuferzellen durch die Injektion der Inhibitoren gestört wird. Für Muskelvorläuferzellen, die aus den Somiten auswandern und ihr Ziel in den Extremitätenknospen finden, ist, wie bereits in der Einleitung geschildert, die Expression von Lbx1 typisch. Daher wurde Lbx1 als ein Marker für die folgenden Experimente gewählt. Ein anderer Marker für migrierende MPCs ist Pax3, weswegen auch die Pax3-Expression als Indikator verwendet wurde.

4.1.1. Wanderung von Muskelvorläuferzellen nach AKT-Inhibitor-Injektion

AKT ist ein phosphorylierendes Protein im Signaltransduktionsweg, welches auch unter dem Namen Proteinkinase B bekannt ist. Dieses Protein ist Bestandteil der Phosphatidylinositol-3K/PDK1/AKT Signalkaskade und somit ein Regulator der Myogenese. Jiang et al. (1999) konnten in Zellkulturexperimenten zeigen, dass eine Blockierung des AKT-Proteins zur Hemmung der myogenen Differenzierung führt, wohingegen dessen Überexpression zur Induktion der Myogenese führt.

Diese Beobachtungen sollten nun am *in vivo* Modell überprüft werden, indem ein spezifischer AKT-Inhibitor in die Somiten injiziert wurde, um eine gezielte Manipulation der Muskelvorläuferzellen noch in den Somiten zu erreichen. Für die hierbei erzielten Ergebnisse wurden sich entwickelnde, befruchtete Hühnereier im HH Stadium 13 verwendet. Dabei wurden sowohl der AKT-Inhibitor als auch die anderen Inhibitoren auf die gleiche Art und Weise in die linke Somitenreihe (Somiten 16-19) injiziert, wobei die rechte Somitenreihe nicht manipuliert wurde, wodurch eine interne Negativkontrolle entstand. Da die bilaterale Anlage der Somiten eine unabhängige Entwicklung der rechten und linken Vorderextremität gewährleistet, konnte diese als Kontrolle dienen. Um jedoch eine zusätzliche Vergleichsmöglichkeit zu schaffen, wurden auch nicht injizierte Embryonen insgesamt sieben Tage bebrütet und anschließend präpariert, wodurch sich grob abschätzen ließ, wie viele Embryonen durch die Manipulation starben.

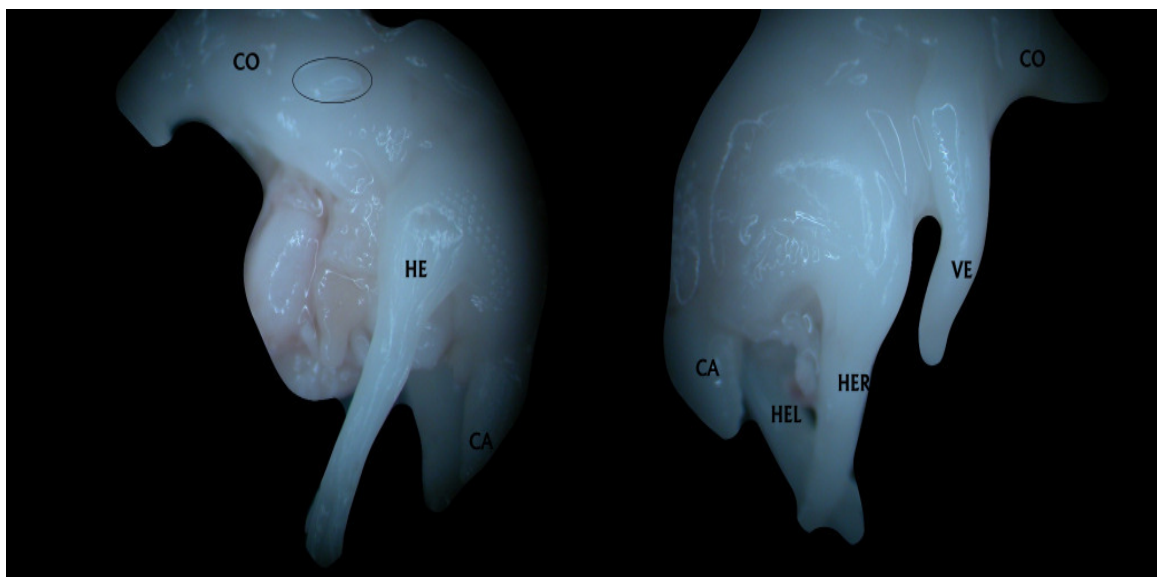


Abbildung 4.1: AKT-Inhibitor Injektion (I). Die linke Abbildung zeigt einen Hühnerembryo, der nach der Injektion im HH Stadium 13 fünf weitere Tage inkubiert und anschließend präpariert wurde. Auf der Abbildung (schwarzer Kreis) ist deutlich zu erkennen, dass sich die vordere, linke Extremität nicht ausgebildet hat. Die hintere linke Extremität (mit HE gekennzeichnet), an der keine Manipulation vorgenommen wurde, zeigt hingegen keine offensichtlichen Veränderungen. Außerdem zeigt der Embryo nach Injektion des AKT-Inhibitors in die linke Somitenreihe eine völlig normal entwickelte rechte, vordere Extremität (gekennzeichnet mit VE) ohne Anzeichen einer Fehlbildung oder mangelhafter Ausbildung des potentiellen Flügels. Weiterhin kennzeichnet CO (Collum) den Hals, CA (Cauda) den Schwanz des Embryos, HER die rechte hintere Extremität und HEL die linke hintere Extremität. Wie in den folgenden Abbildungen auch, ist jeweils der Kopf des Embryos abgetrennt.

Das Ergebnis der Injektion des AKT-Inhibitors veranschaulicht Abbildung 4.1. Hierbei zeigt sich, dass die vordere linke Extremität, in die der AKT-Inhibitor injiziert wurde, überhaupt nicht ausgebildet ist, während die rechte vordere Extremität normal entwickelt ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Mikroinjektion des Inhibitors das beobachtete Fehlen der

Extremität verursacht hat. Weiterhin ist an der fehlenden Extremität auch das Expressionsmuster von Lbx1 oder Pax3 nicht zu beurteilen, da die MPCs nicht in eine nicht vorhandene Extremität einwandern können. Zwar lässt sich für die vordere rechte und die hintere linke und rechte Extremität das Expressionsmuster beurteilen, nur ist dies in Bezug auf die Migration der MPCs in die linke vordere Extremität nicht aussagekräftig. Daher wurden mit den Abbildungen 4.1. und 4.2. Bilder ausgewählt, bei denen keine Whole mount in situ Hybridisierungen durchgeführt wurden.

In drei unabhängigen Sitzungen wurden für die Injektion des AKT-Inhibitors insgesamt 65 befruchtete Hühnereier vorbereitet, von denen wiederum 30 zur Injektion geeignet waren (Kriterien: mindestens 19 Somiten ausgebildet, Herzschlag vorhanden, Keimscheibe intakt). In diese 30 Embryonen konnte der AKT-Inhibitor injiziert werden. Von den 30 injizierten Embryonen, lebten nach weiteren fünf Tagen Inkubation im Bebrüter bei 38°C noch 15. Sieben dieser Embryonen zeigten die in den Abbildungen 4.1. und 4.2. gezeigten Veränderungen.

Die Abbildung 4.2. zeigt einen weiteren Embryo, dessen linke vordere Extremität nicht ausgewachsen ist.

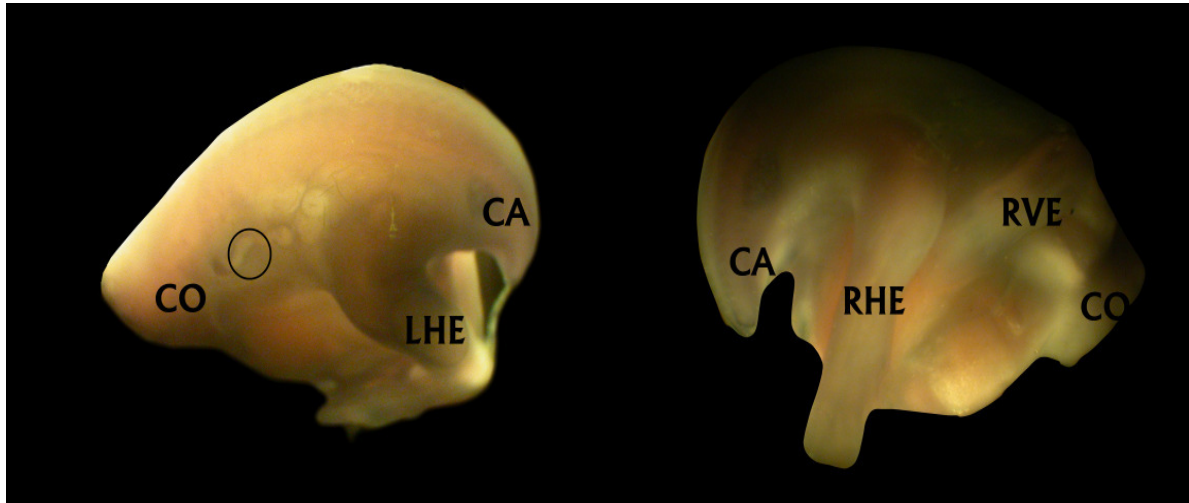


Abbildung 4.2:AKT-Inhibitor Injektion (2). Der schwarze Kreis zeigt, dass auch hier nach AKT - Inhibitor Injektion die linke vordere Extremität fehlt, während die linke hintere Extremität (LHE), die rechte vordere Extremität (RVE) und die rechte hintere Extremität (RHE) völlig normal ausgebildet sind. CO (Collum) kennzeichnet den Hals und CA (Cauda) den Schwanz des Embryos.

4.1.2. Wanderung von Muskelvorläuferzellen nach Injektion von MEK, PKC, JNK und Ly294002-Inhibitoren

Das MEK-Protein ist wichtiger Bestandteil unter anderem des Ras/Raf/MEK/ERK1/2 Signaltransduktionsweges und somit auch bedeutend für die Myogenese. Die Interaktion von Ras mit Raf führt zu einer Aktivierung von MEK, welches über die MAP-Kinase die ERK1/2 Proteine phosphoryliert, was wiederum zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren führt und eine veränderte Genexpression nach sich zieht. Für den geschilderten Signalweg konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der hier verwendete MEK-Inhibitor (U0126) in der Lage ist, die Entwicklungsfähigkeit der Muskelvorläuferzellen zu hemmen (Kwecińska et al., 2005).

Die Injektion des MEK-Inhibitors (U0126) in die linke Somitenreihe (Somiten 16-19) führte zu keiner Änderung der Expressionsmuster von Pax3 und Lbx1, den Markern für die Migration der Muskelvorläuferzellen. Linke und rechte Vorderextremität zeigten dasselbe Muster, wodurch ein Effekt des MEK-Inhibitors auf die Wanderung der Muskelvorläuferzellen durch diese *in vivo* Injektion nicht nachgewiesen werden konnte.

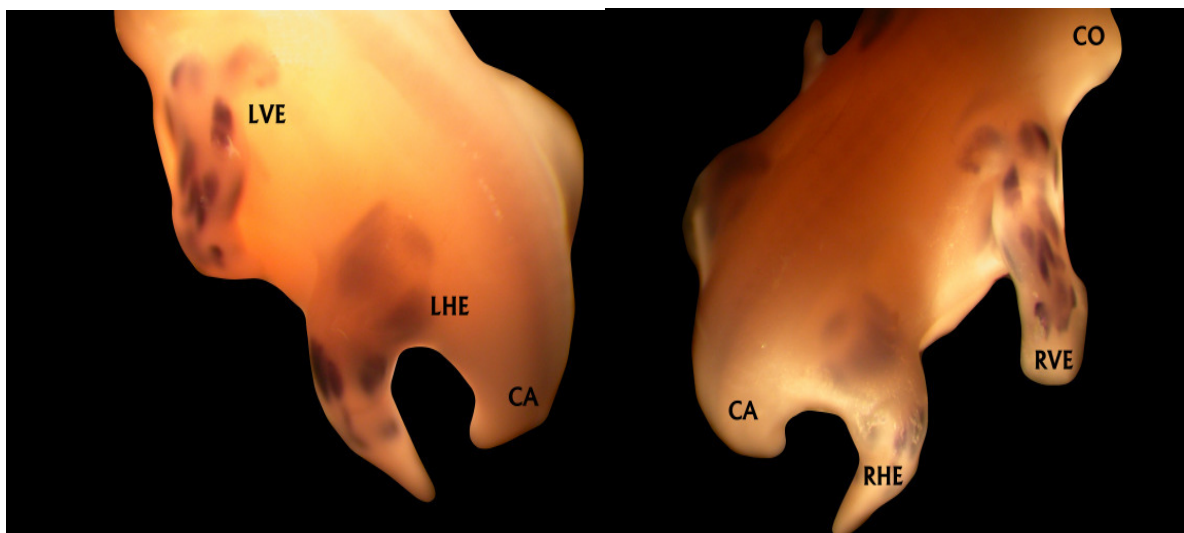


Abbildung 4.3:MEK-Inhibitor Injektion (1). Vergleicht man die linke vordere Extremität (LVE), in die der MEK-Inhibitor injiziert wurde, mit der rechten vorderen Extremität (RVE) des Embryos so fällt auf, dass im Expressionsmuster von Lbx1 zwischen den beiden Extremitäten keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen sind. Es kann also durch diese *in vivo* Injektion kein Effekt des MEK-Inhibitors auf die Wanderung der Muskelvorläuferzellen nachgewiesen werden. LHE kennzeichnet die linke hintere Extremität, RHE die rechte hintere Extremität. CA (Cauda) steht für den Schwanz, und CO (Collum) für den Hals des Embryos.

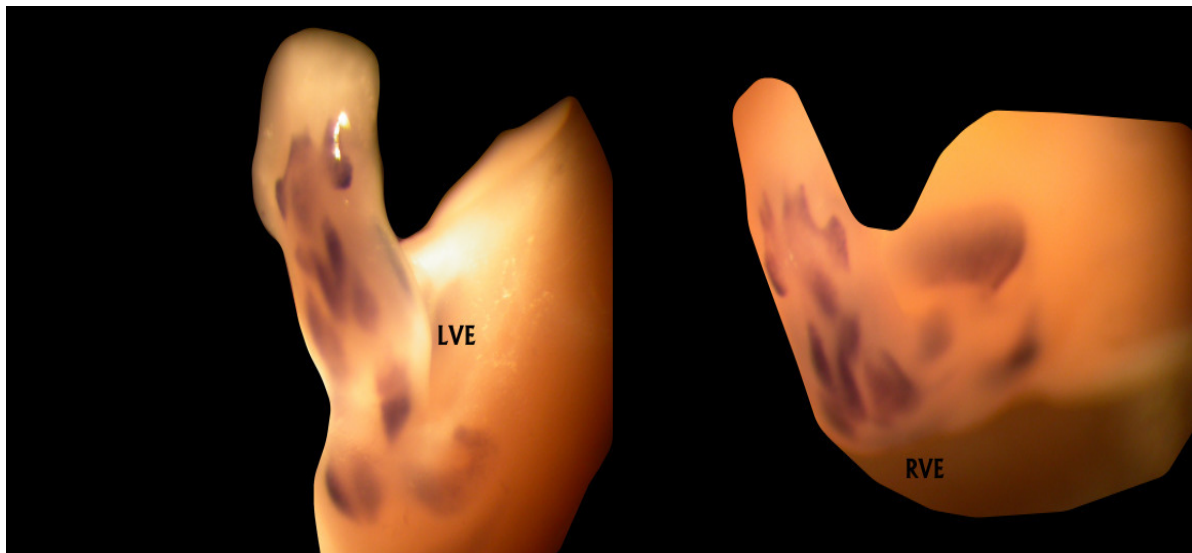


Abbildung 4.4:MEK-Inhibitor Injektion (2). Auch in der Nahaufnahme zeigen sich keine entscheidenden Unterschiede im Expressionsmuster von *Lbx1* zwischen linker (LVE) und rechter (RVE) vorderer Extremität nach Injektion des MEK-Inhibitors in die Somiten 16-19 der linken Seite.

Um sicher zu stellen, dass nicht nur makroskopisch keine Veränderungen im Expressionsmuster vorliegen, sondern auch mikroskopisch keine Abweichungen vorhanden sind, wurden die Embryonen nach Anfertigung der Photos an einem Kryostaten mit einer Schichtdicke von 10 μm geschnitten. Anschließend konnten die histologischen Schnitte mit einer Eosin-Übersichtsfärbung angefärbt werden. Wie zu erwarten, zeigte sich mikroskopisch kein verändertes Expressionsmuster von *Lbx1* und *Pax3* und somit auch kein nachzuweisender Effekt.

Für die drei folgenden Inhibitoren Ly294002, PKC und JNK konnten die gleichen Beobachtungen gemacht werden, wie bei dem oben beschriebenen MEK-Inhibitor. Die Phosphatidylinositol-3K/PDK1/AKT-Signalkaskade, die durch den PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002 gehemmt werden kann, führt bei einer Inhibierung *in vivo* sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch zu keiner Veränderung im Expressionsmusters von *Lbx1* oder *Pax3*. Gleiches gilt für den JNK-Inhibitor und den PKC-Inhibitor (PKC-MARCKS-Kaskade). Weiterhin konnte auch das fehlende Auswachsen der linken vorderen Extremität, wie nach AKT-Inhibitor Injektion, bei keinen der genannten Inhibitoren (MEK, Ly294002, PKC, JNK) beobachtet werden.

Tabelle 4: Tabellarische Zusammenfassung aller durchgeführten Präparationen beziehungsweise Injektionen und deren Auswertung.

| <u>Inhibitor</u> | <u>Anzahl vorbereiteter Embryonen</u> | <u>Anzahl injizierter Embryonen</u> | <u>Überlebende Embryonen</u> | <u>WISH verändert bei Pax 3</u> | <u>WISH verändert bei Lbx1</u> | <u>Makroskopische Veränderungen</u> | <u>Mikroskopische Veränderungen</u> |
|------------------|---|---|----------------------------------|---|--|---|---|
| PKC | 95 | 60 | 35 | nein | nein | keine | keine |
| JNK | 60 | 45 | 25 | nein | nein | keine | keine |
| AKT | 65 | 30 | 15 | / | / | Extremitäten nicht ausgewachsen | / |
| MEK | 110 | 60 | 44 | nein | nein | keine | keine |
| Ly294002 | 80 | 45 | 28 | nein | nein | keine | keine |

4.2. Wanderung von Muskelvorläuferzellen *in vitro*

Eine andere Methode zur Untersuchung des Einflusses von Signalkaskaden-Inhibitoren auf die Migration, sind *in vitro* Studien. Sie ermöglichen es, den Phänotyp vieler gleicher Zellen in einer begrenzten, definierten Umgebung zu untersuchen. Zur Überprüfung des Einflusses der Signalkaskaden-Inhibitoren auf die Migration wurde die murine Zelllinie C2C12 ausgewählt. Die myogenen C2C12-Zellen wurden von embryonalen Maus-Myoblasten abgeleitet und stellen ein geeignetes *in vitro* Modell für das Studium der Myoblastenproliferation und -differenzierung dar (Yaffe und Saxel, 1977). Die Migration der C2C12-Zellen wurde mit Hilfe eines Boyden Chamber Assays untersucht.

Das Protein AKT ist wesentlicher Bestandteil der Phosphatidylinositol-3K/PDK1/AKT Signalkaskade. Der Einfluss des AKT-Inhibitors auf die Migration der Muskelvorläuferzellen konnte, aufgrund des fehlenden Auswachsens der Extremität, *in vivo* nicht beurteilt werden.

In vitro konnte jedoch gezeigt werden, dass AKT die Migration von C2C12-Zellen hemmt (Jiang et al., 1999). Je nach Versuchsanordnung und Konzentration des AKT-Inhibitors zeigt jedoch die Hemmung der Migration ein unterschiedliches Ausmaß. Die Ergebnisse der ersten Versuchsanordnung sind in Abbildung 4.5. dokumentiert. Hierbei wurden pro Zellkulturschale, nach Abzug des alten Mediums, 4 ml Lösung (DMEM-Medium und AKT-Inhibitor (Konzentration: 20 μ M)) aufgetragen und die Zellsuspension 30 Minuten mit diesem Medium inkubiert. Anschließend konnte die Suspension abgezogen und die Zellen ausgezählt werden, um sie dann in der Kammer für sechs Stunden im Inkubator migrieren zu lassen. Es zeigte sich, dass die mit dem AKT-Inhibitor behandelten Zellen in ihrer Migrationsfähigkeit gehemmt wurden, also insgesamt weniger Zellen die zwischen den Kammern eingespannte Membran durchwanderten.

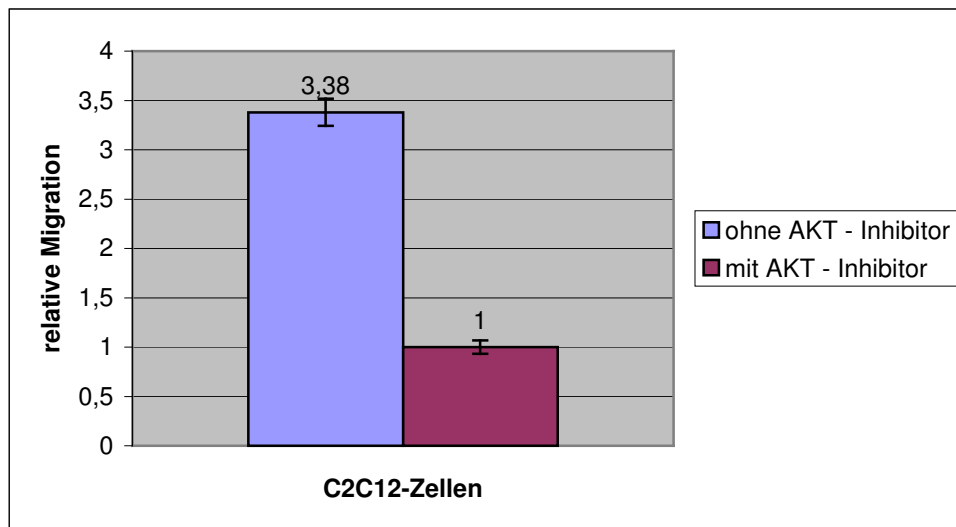


Abbildung 4.5: Migration unter AKT-Inhibitor (I). Die Abbildung zeigt, dass, nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden, die 3,38-fache Zahl an Zellen ohne AKT-Inhibitor gewandert sind verglichen mit den durch AKT-inhibierten Zellen.

In einer zweiten Versuchsanordnung wurde die Zellsuspension (DMEM und AKT-Inhibitor (Konzentration 10 μM) in die obere Kammer pipettiert, so dass die Zellsuspension mit dem AKT-Inhibitor die gesamten sechs Stunden in der Kammer migrieren konnte. Im Vergleich zur ersten Versuchsanordnung liegt hier die Konzentration bei 10 μM (erste Versuchsanordnung 20 μM) und die Zellen wurden mit dem Inhibitor sechs Stunden inkubiert (erste Versuchsanordnung 30-minütiger Kontakt des Inhibitors mit den Zellen). Auch in der zweiten Versuchsanordnung zeigte sich, dass der AKT-Inhibitor zu einer Hemmung der Migration der C2C12-Zellen führt (siehe Abbildung 4.6).

Die erhaltenen Ergebnisse sind in beiden Versuchsanordnungen laut Mann-Whitney U-Test statistisch signifikant ($p < 0,001$).

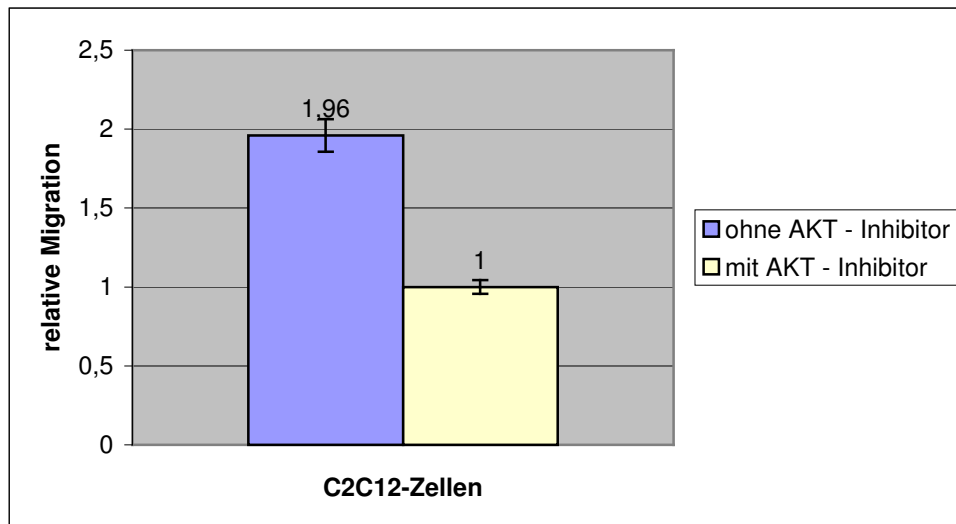


Abbildung 4.6: Migration unter AKT-Inhibitor (2). Die Abbildung zeigt, dass, nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden, die 1,96-fache Zahl an Zellen ohne AKT-Inhibitor gewandert sind verglichen mit den durch AKT-inhibierten Zellen.

Weiterhin wurden, dem Schema der zweiten Versuchsanordnung folgend, die MEK- (Konz. 10 mM), PKC- (Konz. 0,65 mM), PI3-Kinase- (Konz. 10 mM) und JNK- (Konz. 0,5 mM) Inhibitoren in Zellsuspension in die obere Kammer pipettiert und anschließend sechs Stunden in der Kammer inkubiert. Hierbei zeigte sich keine Hemmung der Migration von C2C12-Zellen.

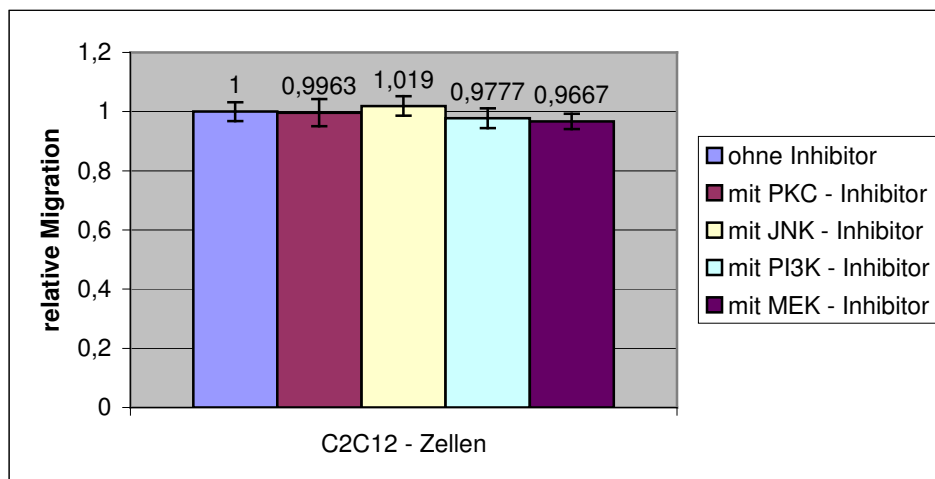


Abbildung 4.7: Migration von PKC-, JNK-, MEK- und PI3-K-Inhibitoren. Das Diagramm zeigt, dass die PKC-, JNK-, MEK-, und PI3-K-Inhibitoren die Migration der C2C12-Zellen in der Boyden Chamber Assay nicht hemmen.

5. Diskussion

Die hier vorliegende Arbeit setzte sich das Ziel herauszufinden, welche Signalkaskaden bei der Migration der Muskelvorläuferzellen *in vivo* eine wichtige Rolle spielen. Bislang kennt man einige für die Migration wichtige Signalkaskaden nur aus *in vitro* Experimenten. Zur Überprüfung dieser Erkenntnisse *in vivo* liegen jedoch noch keine Veröffentlichungen vor. Hierzu wurde der Einfluss von Inhibitoren (AKT-, PKC-, MEK-, JNK- und PI3K-Inhibitoren), die spezifisch für bestimmte Kaskaden sind, auf die MPC-Migration *in vivo* analysiert. Weiterhin stellt sich die Frage, ob eine solche Inhibition der Signalkaskaden *in vivo* durch Injektion von Inhibitoren überhaupt möglich ist.

Die Formierung der Muskulatur im Embryo ist ein komplexes Geschehen, welches noch nicht vollständig verstanden ist. Eine große Anzahl unterschiedlicher Prozesse und Signalketten, die wiederum untereinander in Wechselwirkung treten können, sind in das Auswachsen der Skelettmuskulatur involviert. Viele der Erkenntnisse, gerade im Bereich der Muskelvorläuferzellen und deren Migration, stammen aus Experimenten bei denen bestimmte Gene vermehrt in Muskelvorläuferzellen exprimiert (transgene Tiere) oder ausgeschaltet (Knockout-Experimente) werden. Hierbei sind Gene identifiziert worden, die für die Delaminierung der MPCs vom Dermamyotom und das anschließende gerichtete Wandern der Skelettmuskelvorläuferzellen auf lateralem Wege unerlässlich sind. Diese Gene können in Folgeanalysen als Marker für bestimmte Prozesse genutzt werden. Ein solcher Marker, der die Migrationsfähigkeit, sowie den Determinierungs- beziehungsweise Differenzierungsgrad der Muskelvorläuferzellen widerspiegelt, ist Pax3. Dieses Molekül wird initial noch im gesamten paraxialen Mesoderm exprimiert, bis es sich schließlich spezifiziert und besonders stark von den Zellen der lateralen Dermamyotomlippe exprimiert wird. Eine weiterer Marker, der eine wichtige Rolle spielt, ist Lbx1 (Lady-bird like homeobox 1 Homolog). Zellen, die nicht in der Lage sind das Lbx1-Protein zu produzieren, finden ihr Ziel in der Hinter- und Vorderextremität nicht und können so die Extremitätenknospe nicht erreichen.

Diese zwei Marker, Lbx1 und Pax3, wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Whole mount *in situ* Hybridisierung im Embryo markiert und als Indikator für den Migrationszustand zum Zeitpunkt der Fixierung des Embryos genutzt. Dadurch konnte überprüft werden, welche Auswirkung die Injektion der Signalkaskaden-Inhibitoren auf die Migration der MPCs hat und welche Bedeutung diesen Signalkaskaden *in vivo* zukommt.

Bei der Injektion des AKT-Inhibitors zeigte sich ein vollständiges Fehlen der linken vorderen Extremität, wodurch das Expressionmuster nach AKT-Inhibitor Injektion an der nicht

vorhandenen linken vorderen Extremität nicht beurteilt werden konnte. Zwar konnte das Expressionsmuster der übrigen, ausgewachsenen Extremitäten verglichen werden, da dort jedoch nicht manipuliert wurde, spielt es keine Rolle bei der Auswertung. Bei den anderen Signalkaskaden-Inhibitoren waren keine Veränderungen im Expressionsmuster von Lbx1 und Pax3 zu erkennen. Im Folgenden werden die eben beschriebenen Erkenntnisse diskutiert.

5.1. Mögliche Ursachen der Auswirkung der AKT-Inhibitor Injektion

5.1.1. Expressionsmuster von Lbx1 und Pax3 nach AKT-Inhibitor Injektion

Nach der Injektion des AKT-Inhibitors in die linke Somitenreihe (Somiten 16-19) des *in vivo* Modells Hühnchenembryo zeigte sich in auffälliger Weise, dass es zu einem fehlenden Auswachsen der linken vorderen Extremität kommt. Die Frage, die sich nun stellt ist, was die Ursachen für eine solche Fehlentwicklung sein können?

Hierbei ist grundsätzlich festzustellen, dass bei insgesamt ca. 400 für die Injektion präparierten und ca. 240 injizierten Eier nur die mit dem AKT-Inhibitor behandelten Embryonen ein Fehlen der linken, vorderen Extremität zeigten. Dies lässt darauf schließen, dass die beobachtete Fehlbildung nicht durch die Injektionstechnik an sich bedingt sein kann. In drei unabhängigen Sitzungen wurden insgesamt 60 Eier für die Injektion des AKT-Inhibitors vorbereitet, wovon 30 geeignet waren und nach fünf Tagen Inkubation noch 15 Embryonen lebten. Davon zeigten wiederum sieben Embryonen, das fehlende Auswachsen der linken, vorderen Extremität.

Nach der Whole mount in situ Hybridisierung fiel auf, dass das Expressionsmuster von Lbx1 und Pax3 auf der vorhandenen rechten Vorderextremität keine Veränderung aufweist. Diese Beobachtung überrascht nicht, da bei einer bilateralen Extremitätenanlage und einer Injektion in die linke Somitenreihe die rechte Extremität erwartungsgemäß unbeeinflusst bleibt. Die eigentlich interessante linke Extremität ist jedoch nicht ausgewachsen und zeigt somit auch keine eingewanderten MPCs. Von den insgesamt 15 überlebenden Embryonen zeigten, wie eben geschildert, sieben eine Fehlbildung und sechs Embryonen keine offensichtlichen Veränderungen. Vergleicht man bei diesen Embryonen das Expressionsmuster von Lbx1 und Pax3 der linken mit der rechten, vorderen Extremität fielen keine Unterschiede auf. Man muss

jedoch davon ausgehen, dass bei diesen Embryonen die Injektion des AKT-Inhibitors in die Somiten fehlerhaft verlaufen ist, und somit das unveränderte Expressionmuster nicht aussagekräftig ist. Obwohl der AKT-Inhibitor *in vitro* dafür bekannt ist, dass er die Migrationsfähigkeit der Muskelvorläuferzellen und damit deren Differenzierungsgrad hemmt ist davon auszugehen, dass, selbst wenn die Migrationsfähigkeit der embryonalen Vorläuferzellen beeinflusst würde, dies nicht die Ursache für ein vollständiges Fehlen der Extremität sein kann, sondern eher zur fehlerhaften Ausbildung einzelner Muskelgruppen führen würde. Für das fehlende Auswachsen der Extremität im Ganzen nach AKT-Inhibitor Injektion sind vermutlich Wechselwirkungen von AKT mit anderen Mechanismen und Signalen notwendig, die im Folgenden beschrieben werden.

5.1.2. *Mögliche Interaktion zwischen dem AKT-Inhibitor und anderen die Extremitätenentwicklung beeinflussenden Faktoren, insbesondere FGF*

In den folgenden Ausführungen sollen, anhand des stadienhaften Verlaufs der Extremitätenentwicklung des Huhns, potentielle Interaktionspunkte zwischen dem AKT-Inhibitor und den für eine regelgerechte Ausbildung der Extremität entscheidenden Signalen diskutiert werden.

In Hühnerembryonen beginnen sich die Extremitätenanlagen ab dem dritten Tag nach der Eiablage zu entwickeln. Zu diesem Zeitpunkt sind die Strukturen entlang der Körperhauptachse bereits im Großen und Ganzen angelegt. Aus kleinen Auswüchsen, den Extremitätenanlagen oder -knospen (siehe Abbildung 5.1.), die aus dem Körper des Embryos herauspfeifen, entwickeln sich die Gliedmaßen. Frühe Stadien der Extremitätenknospe sind

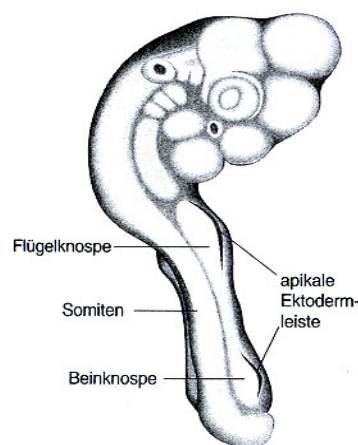


Abbildung 5.1: Die Extremitätenknospen des Hühnerembryos. Am dritten Tag der Bebrütung erscheinen die Extremitätenknospen an den Seiten des Embryos. Sie bestehen aus einer äußeren Schicht Ektoderm und Mesoderm. An der Spitze jeder Knospe verläuft eine längliche Ektodermverdickung, die apikale Ektodermleiste. Darstellung aus Wolpert., 1999.

also bereits zum Zeitpunkt der Injektion des AKT-Inhibitors ausgebildet, wodurch hier eine Manipulation der im folgenden beschriebenen Schichten möglich ist. Die frühe Extremitätenknospe besteht vor allem aus zwei Zellschichten: außen aus einer Schicht epithelialen Ektoderms und innen aus einem lockeren Verband mesenchymaler Mesodermzellen. Der größte Teil der Extremität entwickelt sich aus dem mesenchymalen Kern, während die späteren Muskelzellen aus den Somiten in die Knospe einwandern. Ganz an der Spitze der Extremitätenknospe befindet sich eine Verdickung des Ektoderms - die apikale Ektodermleiste (auch „apical ectodermal ridge“). Diese induziert die unmittelbar darunter liegende Wachstumszone (auch „progress zone“), eine Schicht aus sich rasch teilenden undifferenzierten Zellen in welcher andere Zellen ihre positionale Identität enthalten. Erst wenn die Zellen die Wachstumszone verlassen, beginnen sie zu differenzieren. Im weiteren Verlauf des Auswachsens der Knospe differenzieren immer mehr Zellen, und im Mesenchym erscheinen die ersten Knorpel Elemente. Dabei startet die Differenzierung von dem am Rumpf nächstgelegenen Bereich, um dann mit zunehmender Länge der Extremität nach distal voran zu schreiten (Wolpert, 1999).

Die frühe Extremitätenknospe besitzt noch ein großes regulatives Potential. Es ist beispielsweise möglich ganze Stücke aus ihr zu entfernen, umzusetzen oder zu verdrehen ohne dass dabei die Musterbildung beeinträchtigt würde. Zwei Zonen der Extremitätenknospe können jedoch dieser Regel nicht unterworfen werden. Dabei handelt es sich um zwei Organisationszentren, zum einen die schon bekannte apikale Ektodermleiste und zum anderen die Zone polarisierender Aktivität (ZPA), auch als polarisierende Region bezeichnet. Diese befindet sich am posterioren Rand des Mesenchyms. Entfernt man einem Embryo die vordere Hälfte der Extremitätenknospe, so hat dies keine entscheidenden Auswirkungen, denn die betreffende Extremität, also Flügel oder Bein, entwickeln sich normal. Nimmt man dagegen den hinteren Teil der Extremitätenknospe, also den Teil mit der polarisierenden Region, so führt dies zu einer abnormen Gliedmaßenentwicklung. Um die Ursache dieses Phänomens besser verstehen zu können, dient ein Modell bei dem die Musterbildung auf Positionsinformationen beruht. In diesem Modell wird das künftige Schicksal einer Zelle in einem sich entwickelnden Hühnerflügel oder -bein anscheinend wesentlich durch dessen Position relativ zu den drei Hauptachsen festgelegt. Den Positionswert entlang der proximo-distalen Achse könnte ein zeitabhängiger Mechanismus liefern, der die Aufenthaltsdauer einer Zelle in der Wachstumszone misst und ihr beim Verlassen der Zone die entsprechende Koordinate mitgibt. Das Positionssignal auf der Dorsoventralachse liefern dabei Signale aus der apikalen Ektodermleiste. Entlang der antero-posterioren Achse wird die Musterbildung

durch ein oder mehrere Signale bestimmt, die von der polarisierenden Region am posterioren Rand der Gliedmaßenknospe ausgehen. Wegen ihres Einflusses auf die darunter liegende Wachstumszone ist die apikale Ektodermleiste sowohl für das Längenwachstum als auch für die proximo-distale Musterbildung unentbehrlich. Entfernt man beispielsweise beim Hühnerembryo die Apikalleiste mikrochirurgisch aus der Extremitätenknospe, so bleibt die betreffende Extremität deutlich im Wachstum zurück und ihre distalen Elemente werden nicht mehr ausgebildet. Nach Entfernung der Apikalleiste geht weiterhin die Zellteilungsaktivität in der Wachstumszone massiv zurück. Die Apikalleiste sendet also Signale an die Wachstumszone. Das dies tatsächlich so ist, lässt sich zeigen, indem man eine isolierte apikale Ektodermleiste auf die dorsale Oberfläche einer Extremitätenknospe im frühen Stadium verpflanzt. Die Knospe wächst dann zweifach aus, wobei sich in der ektopischen Extremität sogar Knorpelstrukturen bis hin zu Fingerstrahlen bilden können (Wolpert, 1999). Für die Übertragung dieser Signale aus der Apikalleiste werden Proteine der FGF-Familie verantwortlich gemacht. FGF-8 wird in der gesamten Leiste exprimiert, während FGF-4 eher im posterioren Bereich lokalisiert ist. Das FGF-4/8 Protein kann die Apikalleiste funktionell ersetzen. Wenn man die Leiste entfernt und an Stelle dessen FGF-4/8 kontinuierlich zuführt, dann geht die Entwicklung der Extremität mehr oder weniger normal weiter und es entsteht eine nahezu perfekt ausgebildete Gliedmaße (Wolpert, 1999).

Wenn also FGFs in der Lage sind, die Ausbildung einer zusätzlichen, regelgerecht entwickelten Extremität zu induzieren, dann kann man im Umkehrschluss die Behauptung aufstellen, dass eine Interaktion zum Beispiel des AKT-Inhibitors mit einer FGF-vermittelten Signalkaskade zur fehlerhaften Ausbildung der Extremität führen kann. Ein solcher Zusammenhang, der spezifisch das fehlende Auswachsen der Hühnchenextremität mit einer Interaktion zwischen FGF und dem AKT-Inhibitor begründet, ist noch nicht beschrieben worden. Es gibt jedoch einige Veröffentlichungen, die einen Zusammenhang zwischen der PI3/AKT-Kaskade und FGF beschreiben (siehe unten).

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren sind Heparin-bindende Polypeptide die ihre Signale an die Zelle über die Familie der Tyrosin-Kinase Rezeptoren weiterleiten (FGFR1-FGFR4; Shaoul et al., 1995). Die FGFs regulieren das Wachstum, die Differenzierung, das Überleben und die Migration einer Vielzahl verschiedener Zelltypen und spielen eine wichtige Rolle in zahlreichen Entwicklungsprozessen (Powers et al., 2000). Sowohl Studien an Mäusen und Hühnchen aus dem Bereich der Entwicklungsbiologie als auch genetische Analysen aus der Humangenetik (zum Beispiel zur Polydaktylie), zeigen die immense Bedeutung der durch FGF gesteuerten Signalwege für viele verschiedenen Stadien der Extremitätenentwicklung.

So werden beispielsweise Mutationen an FGFRs für eine abnorme Entwicklung der menschlichen Extremitäten verantwortlich gemacht (Tickle und Münsterberg, 2002; Wilkie et al., 2002). Expressionsanalysen von FGF in frühen Stadien der Extremitätenentwicklung von Hühnchen identifizierten FGF 8 und 10 als Hauptregulatoren des Extremitätenwachstums (Martin, 1998; Tickle und Münsterberg, 2002). FGF 10 wird im mesenchymalen Anteil der Extremitätenknospe exprimiert und ist unerlässlich für die Ausbildung der Extremität (Sekine et al., 1999). FGF 8 dagegen wird in der gesamten Apikalleiste exprimiert. Während das Fehlen von FGF 8 zu skeletalen Fehlentwicklung führt, so bleibt die initiale Phase des Auswachsens der Extremität unbeeinflusst (Lewandowski et al., 2000). Andere FGFs, wie zum Beispiel FGF 2, 4, 9, oder 17, werden ebenfalls in der Apikalleiste exprimiert, sie scheinen jedoch im Vergleich zu FGF 8 und 10 eine eher untergeordnete Rolle bei der Musterbildung und dem Auswachsen der Extremität zu spielen (Tickle und Münsterberg, 2002; Niswander et al., 2003). Wenn man sich noch einmal vor Augen führt, dass FGF 2,4 und 8 in der Lage sind die apikale Ektodermleiste zu ersetzen und die Entstehung einer neuen, zusätzlichen Extremität zu induzieren, wird einem klar, welche immense Bedeutung der FGF-Familie bei der Extremitätenentwicklung zukommt.

Nach dem heutigen Kenntnisstand müsste man wohl eine Interaktion des AKT-Inhibitors mit FGF 8 und 10 vermuten, da diese die Hauptregulatoren des Auswachsens der Extremität sind. Kawakami et al. (2003) bestätigen diese Vermutung. Nach Kawakami et al. (2003) spielt ein Protein namens MKP3 („mitogen activated protein kinase phosphatase 3), welches durch FGF 8 über die PI3K/AKT-Signalkaskade aktiviert wird, eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Hühnchenextremität. MKP3 ist bereits als Regulator der MAPK/ERK-Kaskade bekannt und wird im Mesenchym aktiviert. Hemmt man MKP3 durch Einsatz einer siRNA (small interfering RNA) führt dies zur Apoptose. Folglich nimmt MKP3 eine Schlüsselrolle in der durch die apikale Ektodermleiste vermittelten FGF8-Signalkaskade ein, denn MKP3 ist ein proliferativ und anti-apoptotisch wirkendes Protein (Kawakami et al., 2003). Unterbricht man durch die Injektion des AKT-Inhibitors den Signalweg FGF8/PI3K/AKT/MKP3, könnte dies zu einer fehlenden Aktivierung von MKP3 führen, dessen proliferativen und anti-apoptotischen Effekt hemmen und so das fehlende Auswachsen der Extremität erklären.

Andere Veröffentlichungen beschreiben ebenfalls Zusammenhänge zwischen AKT und FGF. Maffucci et al. (2005) beschreiben einen Zusammenhang zwischen FGF 2, der Phosphatidylinositol-3/AKT Kaskade und dessen Inhibitor Inositol(1,3,4,5,6)-pentakisphosphatase (Ins(1,3,4,5,6)P5), wobei allerdings diese Erkenntnisse aus der

Angiogenese stammen. Sie konnten zeigen, dass Ins(1,3,4,5,6)P5 die durch FGF 2 vermittelte Phosphorylierung von AKT blockiert und somit das Überleben und die Migration von Endothelzellen aus menschlichen Nabelvenen inhibiert. Auch Sulpice et al. (2002) machten an Endothelzellen die Beobachtung, dass FGF 2 Signale über die PI3/AKT-Kinase weiterleitet. Dubrelle und Pourquie (2004) konnten zeigen, dass die Transkription der FGF 8 messenger RNA an bestimmten Bereichen des Embryos verstärkt auftritt, dort entsprechend vermehrt das FGF 8 Protein gebildet wird und die Expression von FGF 8 wiederum mit dem Phosphorylierungsgrad von AKT korreliert. AKT ist also ein downstream Effektor des FGF-Signalwegs.

Die in dieser Arbeit erstmals geschilderte Beobachtung, dass eine Inhibition der PI3/AKT-Signalkaskade *in vivo* zu einem fehlenden Auswachsen einer Extremität führt, bestätigt die oben aufgeführten Veröffentlichungen über den Zusammenhang zwischen FGF und AKT und zeigt, dass das Zusammenwirken von FGF und AKT für die Extremitätenentwicklung von entscheidender Bedeutung ist. Offenbar kann die FGF/PI3/AKT-Signalkaskade *in vivo* durch keinen anderen Signalwege effizient ersetzt werden, denn sonst wäre ein vollständiges Fehlen der Extremität nicht möglich.

Nachdem bislang bei der Suche nach der möglichen Ursache für die Extremitätenfehlbildung hauptsächlich die apikale Ektodermleiste betrachtet wurde, so scheint auch eine Manipulation des zweiten, wichtigen Organisationszentrum, nämlich der polarisierenden Region, durch den AKT-Inhibitor möglich. Die polarisierende Region ist unter anderem am Erhalt der apikalen Ektodermleiste beteiligt, wahrscheinlich mittels der Wachstumsfaktoren BMP-2 und BMP-4. BMPs (Bone morphogenetic proteins) bilden eine Untergruppe der TGF- β -Familie und kontrollieren fundamentale Ereignisse in der frühen embryonalen Entwicklung und in der Organogenese. Wenn man davon ausgeht, dass die BMPs Signale an die apikale Ektodermleiste über die PI3K/AKT-Signalkaskade weiterleiten und so zu ihrer Aufrechterhaltung beitragen, könnte man dies möglicherweise als Ursache für das fehlerhafte Auswachsen der Extremität annehmen. Ein Zusammenhang zwischen BMP-2 und AKT bei der Extremitätenentwicklung des Hühnchens wurde bislang nicht beschrieben, aus der Osteogenese ist jedoch bekannt, dass BMP-2 die PI3K/AKT-Kaskade stimuliert und so Osteoblasten aktiviert (Gosh-Choudhury et al., 2002).

Weiterhin gibt es eine positive Rückkopplung zwischen dem Sonic-hedgehog-Protein, welches in der polarisierenden Region der Gliedmaßenknospe exprimiert wird und an zahlreichen Musterbildungsvorgängen beteiligt ist, und der Expression von FGF 4 in der Apikalleiste. Wie oben bereits beschreiben, tritt die PI3K/AKT-Kaskade in Wechselwirkung

mit FGFs. Die Interaktion zwischen Sonic hedgehog und FGF 4 lässt sich durch die Induzierung zusätzlicher, falsch platzierter Gliedmaßen nachweisen. Eine lokale Gabe von FGF 4 auf die Körperflanke eines Hühnerembryos zwischen vorderer und hinterer Knospe induziert die Produktion von FGF-8 im Ektoderm und anschließend die ektopische Expression von Sonic hedgehog. Dieses löst dann wiederum die Expression des embryonalen Gens FGF 4 aus und trägt zum Fortbestand der Apikalleiste und zum Auswachsen einer überzähligen Gliedmaßenknospe an der betreffenden Stelle bei. Wird FGF 4 in den vorderen Bereich der Flanke appliziert entwickelt sich eine zusätzliche Flügelknospe, eine Applikation im hinteren Bereich führt zur Ausbildung einer Beinknospe (Wolpert, 1999).

Es zeigt sich also in den oben aufgeführten Beispielen, dass es mehrere mögliche Signalwege im komplexen Regulationsprozess der Extremitätenentwicklung gibt, die durch die Injektion des AKT-Inhibitors verändert werden und somit das erstmals beobachtete, fehlende Auswachsen der Extremität erklären könnten (siehe Abbildung 5.2). Die wahrscheinlichste Erklärung für das Fehlen der Extremität scheint jedoch im allgemeinen die Interaktion des AKT-Inhibitors mit den FGFs, im speziellen die Wechselwirkung mit der FGF8/PI3K/MKP3-Kaskade zu sein. Denn einerseits ist FGF8, zusammen mit FGF10, einer der wichtigsten Faktoren für das Auswachsen der Extremität, andererseits haben Kawakami et al. (2003) einen konkreten Signalweg (FGF8/PI3K/AKT/MKP3) beschrieben, der zeigt an welcher Stelle der AKT-Inhibitor angreifen könnte. Die Ergebnisse der Arbeit verdeutlichen also den Zusammenhang zwischen AKT und FGF, und weisen darauf hin, dass die PI3K/AKT-Kaskade in der Extremitätenentwicklung eine Schlüsselrolle einnehmen könnte.

Übersicht: Extremitätenentwicklung bei Wirbeltieren

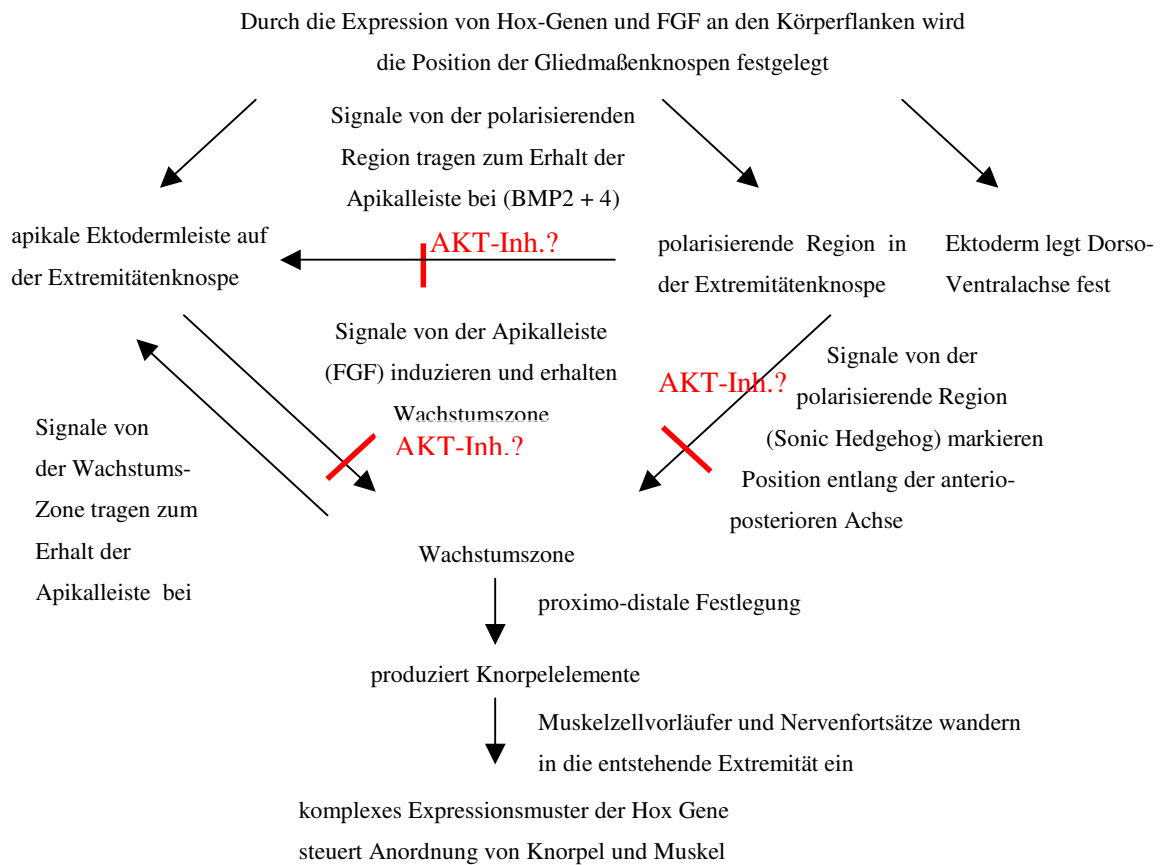


Abbildung 5.2.: Extremitätenentwicklung bei Wirbeltieren. Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Einflussfaktoren auf die Extremitätenentwicklung und Darstellung möglicher Angriffspunkte des AKT-Inhibitors. Eigene Darstellung.

5.2. Injektion der JNK-, MEK-, PKC- und PI3-K-Inhibitoren verändert die Expression von Lbx1 und Pax3 nicht

Durch Injektion der Inhibitoren von JNK, PKC, MEK, und PI3-K zeigten sich nach Whole mount in situ Hybridisierung keine Veränderungen der Expression von Lbx1 und Pax3, den Markern der Migration der Muskelvorläuferzellen. Nun bleibt also zu klären, warum *in vivo* eine entsprechende Inhibition der Wanderung der Muskelvorläuferzellen nicht erzielt oder nicht nachgewiesen werden konnte, obwohl *in vitro* für die verwendeten Signalkaskaden-Inhibitoren ein solcher Einfluss beschrieben ist. Es stellt sich also die Frage, ob eine Hemmung der untersuchten Signaltransduktionswege *in vivo* keinen Einfluss auf die MPC-

Wanderung hat oder das Ausbleiben eines Effektes auf die MPC-Wanderung durch die Art und Weise der Durchführung der Experimente zu erklären ist. Dazu werden die einzelnen experimentellen Schritte im Folgenden diskutiert.

Aus Zellkulturexperimenten weiß man, dass die untersuchten Signalkaskaden die Myogenese der Muskelzellen beeinflussen können. In der Zellkultur herrschen aber Bedingungen, die das komplexe Geschehen im embryonalen Organismus nicht exakt widerspiegeln können. Man arbeitet *in vitro* mit Zelllinien, die mehr oder weniger in einer künstlich geschaffenen Umgebung ohne äußere Umwelteinflüsse leben. Daher kann man nicht unbedingt davon ausgehen, dass sich *in vitro* erzielte Ergebnisse auch *in vivo* so widerspiegeln. Wie in der Einleitung bereits anhand des Beispiels der Interaktion zwischen der PI3 und p38-Kinase gezeigt, ist es möglich, dass eine Inhibition einer Kaskade *in vitro* nicht durch eine andere Kaskade kompensiert werden kann, wohingegen eine solche Kompensation im *in vivo* Modell denkbar wäre. Somit würde es dann im *in vitro* Modell beispielsweise zur Inhibition der Migration kommen, während *in vivo* eine solche Hemmung nicht eintritt.

Im folgenden soll nun auf die Art und Weise der Durchführung der Experimente eingegangen werden. Der erste entscheidende Schritt bei der Durchführung der Experimente war die Injektion des Inhibitors in die Somiten 16-19 der Keimscheibe des Embryos. Dabei ist die mikrochirurgische Injektion von Substanzen in die Keimscheibe eine elegante Methode, um Manipulationen am Embryo vorzunehmen. Bei entsprechender Injektionstechnik kann hierbei der Inhibitor exakt in die erwünschten Somiten injiziert werden, die sich dann ballonartig aufblasen. Es ist jedoch nicht möglich bei jeder Injektion das selbe Volumen zu injizieren, da die feine Injektionsnadel nach Manipulation am Embryo häufig verklebt und daher anschließend die Spitze mit einer Mikroschere erneut angeschnitten werden muss. Dadurch ändert sich der Durchmesser der Injektionsnadel und damit auch das injizierte Volumen. Weiterhin kann man nicht exakt vorhersagen, wie lange der Inhibitor an Ort und Stelle einwirken kann und ob die gewählte Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit ausreichend ist. Es ist beispielsweise möglich, dass in der wässrigen Phase des Embryos der Inhibitor stark verdünnt wird. Die in diese Arbeit durchgeführte *in vivo* Injektion der Inhibitoren wurde in dieser Form speziell für diese Inhibitoren noch nie durchgeführt. Daher gibt es darüber bislang keine Vergleiche, die zum Beispiel die Frage beantworten könnten, ob die injizierten Inhibitoren potent genug sind, um *in vivo* einen Effekt auszulösen.

Da man die injizierten Inhibitoren durch Whole mount *in situ* Hybridisierung nicht nachweisen kann, ist eine zweifelsfreie Beurteilung über die erfolgreiche Injektion nicht möglich. Es ist jedoch aufgrund der exakt durchgeführten Injektion (Aufblasen der Somiten

nach Injektion spricht für Inhibitor-Flüssigkeit in den Somiten) und der beobachteten Effekte nach der AKT-Inhibitor Injektion grundsätzlich von einer erfolgreichen Injektionstechnik auszugehen. Weiterhin ist eine Verstümmelung der Extremitäten ausschließlich bei Embryonen aufgetreten in die der AKT-Inhibitor injiziert wurde. Dies legt nahe, dass die Fehlbildung nicht durch die Manipulation an sich bedingt ist, sondern durch die Injektion des Inhibitors und dieser wahrscheinlich seine Wirkung entfalten konnte.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle ist die Whole mount in situ Hybridisierung. Während einer in-situ-, also „vor Ort“-Hybridisierung, werden, an die im Gewebe enthaltenen mRNA-Kopien der exprimierten Gene, komplementäre Dig-markierte RNA-Proben gebunden. Dabei diffundieren die Proben in den zu untersuchenden Embryo und werden nach einer entsprechenden Inkubationszeit mit einem Waschpuffer wieder ausgewaschen. Nun wird ein Antikörper zugegeben der gegen Digoxigenin gerichtet ist und das Enzym alkalische Phosphatase trägt. Nach dem Auswaschen der ungebundenen Antikörper kann ein Substrat hinzugegeben werden, dass nach Umsetzung durch die alkalischen Phosphatase einen blauen Farbton annimmt. Dabei werden selektiv diejenigen Zellen oder Gewebe gefärbt, in denen das zur Probe passende Gen exprimiert wird. Aufgrund der Tatsache, dass die Proben und auch das Farbstoffenzymsubstrat durch Diffusion in das Gewebe eindringen, ist die Entstehung eines Konzentrationsgradienten sowohl von innen nach außen beim Auswaschen als auch von außen nach innen beim Einwaschen zu beachten. Folglich sind vor allem kompakte Gewebe im Inneren des Embryos schwieriger zu Färben als oberflächlich gelegene Gewebe. In solchen Fällen kann es dann aufgrund keiner oder einer sehr schwachen Färbung schwierig sein, diese überhaupt zu erkennen, was zum Übersehen eines möglichen Unterschiedes führen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch zum einen etablierte Proben zur Whole mount in situ Hybridisierung verwendet und zum anderen die Expressionmuster der injizierten mit der nicht - injizierten Extremität verglichen, so dass aussagekräftige Färbungen erzielt werden konnten, die einen Vergleich der beiden Vorderextremitäten zuließen. Um ein Übersehen kleiner mit der Whole mount in situ Hybridisierung nicht beobachtbare Effekte, wie zum Beispiel der Verlust einzelner Muskelgruppen, auszuschließen, wurden die Embryonen am Kryostaten geschnitten. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Effekt der Injektion, neben der makroskopischen Betrachtung, auch mikroskopisch nicht sichtbar wird, ist zwar gering, aber nicht auszuschließen.

Aufgrund des bei AKT beobachteten Effektes und der oben angegebenen Gründe, vor allem in Bezug auf die Durchführung der Versuche, ist es unwahrscheinlich, dass die Injektionstechnik an sich nicht funktioniert hat. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die

Inhibitoren unter den *in vivo*-Bedingungen nicht funktionieren, mit Ausnahme des AKT-Inhibitors, dessen Wirkung aufgrund des beobachteten Effektes sehr wahrscheinlich ist.

5.3. Einfluss der Inhibitoren auf die Migration der C2C12-Zellen im Boyden Chamber Assay

Die Injektion des AKT-Inhibitors führt zu einem fehlerhaften Auswachsen der Extremität *in vivo*. *In vitro* kann der AKT-Inhibitor ebenfalls in die Myogenese eingreifen, indem er die Migration der C2C12-Zellen hemmt. Diese beiden Beobachtungen sind wahrscheinlich jedoch getrennt von einander zu beurteilen, da die Hemmung der Migration der Muskelvorläuferzellen vermutlich nicht Ursache, sondern Folge der genannten Verstümmelung ist. Trotzdem hat sich auch *in vitro* im Boyden Chamber Assay eine Hemmung der Migration der MPCs durch den AKT-Inhibitor gezeigt.

Überraschenderweise ließ sich mittels Boyden Chamber Assay keine Hemmung der Migration der Muskelvorläuferzellen durch die MEK-, PKC-, JNK- und PI3-K-Inhibitoren nachweisen. Einerseits ist bekannt, dass alle inhibierten Signalkaskaden eine wichtige Rolle in der Myogenese spielen. Andererseits wurden diese Beobachtungen nicht ausschließlich an C2C12-Zellen gemacht. Andere Zelllinien haben wiederum unterschiedliche Eigenschaften als C2C12-Zellen, und können daher nicht unbedingt als Vergleichsmodell dienen. Weiterhin wurde in keiner der vorliegenden Veröffentlichungen der Boyden Chamber Assay zur Untersuchung der Migration genutzt und außerdem nicht explizit die Migration der Muskelvorläuferzellen betrachtet. Die bislang erhaltenen Ergebnisse lassen sich so also nicht einfach auf die hier vorgestellten Experimente übertragen. Es stellt sich die Frage, ob die im Boyden Chamber Assay verwendeten Inhibitoren potent genug waren, lange genug auf die Zellen einwirken und somit deren Migration hemmen konnten.

Für die Zukunft wären sowohl für die *in vitro* als auch für die *in vivo* Experimente weitere Versuche von Interesse. Hierbei könnte man vor allem probieren Versuchsbedingungen zu verändern, beispielsweise indem man andere Zelllinien verwendet, um so neue Erkenntnisse zu erzielen.

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die hier vorliegende Arbeit sollte den Einfluss bestimmter Signalkaskaden auf die Migration von Muskelvorläuferzellen untersuchen. Dabei konzentrierten sich die Versuche auf spezifische Inhibitoren (JNK-, PKC-, MEK-, AKT-, und PI3K-Inhibitoren) bestimmter Signalkaskaden, um dessen Bedeutung für die Myogenese zu untersuchen. Es handelt sich hierbei um Signalkaskaden, die *in vitro* als wichtig für die Myogenese beschrieben wurden. Das Ziel der Arbeit war, die Bedeutung der Signalkaskaden für die Myogenese erstmals am *in vivo* Modell zu untersuchen. Die Inhibitoren der Signalkaskadenproteine wurden dafür in die Somiten des Hühnchenembryos injiziert, da der Ursprung der die Extremitätenmuskulatur bildenden Zellen in den aus den Somiten des Vertebratenembryos auswandernden Zellen liegt. Muskelvorläuferzellen lösen sich aus der lateralen Dermatomyotomlippe und wandern über längere Strecken hin zu den Extremitätenknospen. Dabei kann der wichtige laterale Migrationspfad nur beschränkt werden, wenn die MPCs das Gen *Lbx1* exprimieren. Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor der die Migrations- und Differenzierungsfähigkeit widerspiegelt ist *Pax3*. Nach der anschließenden Whole mount *in situ* Hybridisierung konnten nun die Expressionsmuster der zwei Transkriptionsfaktoren *Lbx1* und *Pax3* verglichen werden und so überprüft werden, inwieweit die Inhibitoren *in vivo* Einfluss auf die Migration hatten. Es zeigte sich dabei, dass die Signalkaskaden-Inhibitoren die Expression von *Pax3* und *Lbx1* *in vivo* nicht verändert haben. Die Injektion des AKT-Inhibitors führte jedoch zu einem fehlenden Auswachsen der entsprechenden Extremität. Dadurch konnte das Expressionsmuster und damit die Migration der MPCs nach AKT-Inhibitor Injektion an der linken vorderen Extremität *in vivo* nicht beurteilt werden. Eine mögliche Ursache des fehlenden Auswachsens der Extremität könnte eine Interaktion des AKT-Inhibitors mit den FGFs sein (FGF 8 und 10). Denn für FGFs wurde gezeigt, dass sie nach ektopischer Expression zur Bildung von zusätzlichen Extremitätenknospen führen können. Weiterhin zeigt im Boyden Chamber Assay ausschließlich der AKT-Inhibitor die Fähigkeit, die Migration der Muskelvorläuferzellen zu hemmen. Die anderen Inhibitoren veränderten *in vitro* die Wanderung der C2C12-Zellen nicht.

Zukünftige Experimente könnten sich also mit der Frage beschäftigen, welche Mechanismen verantwortlich für das fehlerhafte Wachsen der Extremität nach Injektion des AKT-Inhibitors sind. Dabei ist vor allem der Zusammenhang zwischen FGF und der PI3K/AKT-Kaskade von Interesse, da dieser am wahrscheinlichsten die Ursache des fehlenden Auswachsens der Extremität ist.

7. Anhang

7. 1. Literaturverzeichnis

1. Aragon, B., Poussard, S., et al. (2002). "Protein Kinase Calpha is a calpain target in cultured embryonic muscle cells." Mol. Cell Biochem **231**: 97-106.
2. Ausubel, F., Brent, R., et al. (1992). Short Protocols in Molecular Biology. Canada, Wiley, S. 1-740.
3. Barton, E.R., Morris, L., et al. (2002). "Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counter muscle decline in mdx mice." J. Cell Biol. **157**: 137-148.
4. Barton-Davis, E.R., Shoturma, D.I., et al. (1998). "Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging - related loss of skeletal muscle function." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**: 15063-15607.
5. Beddington, R., Brockes J., et al. (1999). Entwicklungsbiologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, S. 111-126, S. 350-369.
6. Besson, A., Davy, A., et al. (2001). "Differential activation of ERKs to focal adhesions by PKC epsilon is required for PMA induced adhesion and migration of human glioma cells." Oncogen. **20**: 7398-7407.
7. Bodine, S.C., Gonzalez M., et al. (2001). "Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo." Nat. Cell Biol. **3**: 1014-1019.
8. Bober, E., Franz, T., et al. (1994). "Pax-3 is required for the development of limb muscle: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells." Development **120**: 603-612.
9. Bonavita F., Stefanelli, C., et al. (2003). "H9c2 cardiac myoblasts undergo apoptosis in a model of ischemia consisting of serum deprivation and hypoxia: inhibition by PMA." FEBS Lett. **536**: 85-91.
10. Neuhaus, P., Neuhaus, H. et al., (2006). Cell signaling and growth factors in development. Weinheim, Wiley VCH, S. 641-664.
11. Braun, T., Rudnicki MA., et al. (1992). "Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death." Cell. **71**: 369-82.
12. Brohmann, H., Jagla, K., et al. (2000). "The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells." Development **127**(2): 437-445.
13. Cabane, C., Coldefy A.S., et al. (2004). "The p38 pathway regulates Akt both at the protein and transcriptional activation levels during myogenesis." Cell Signal. **16**: 1405-15.
14. Cavigeli M., Dol F., et al. (1995). "Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation." EMBO J **14**: 5957-5764.

-
15. Charasse, S., Causeret M., et al. (2003). "Rho GTPases and cadherin-based cell adhesion in skeletal muscle development." J Muscle Res Cell Motil. **24**: 309-13.
 16. Clark., E.A. and Brugge, J.S., (1995). "Integrins and signal transduction pathways: The Road Taken." Science **268**: 233-239.
 17. Cohn MJ., Izpisua-Belmonte JC., et al. (1995). "Fibroblast growth factor induce additional limb development from the flank of chick embryos." Cell **80**: 739-46.
 18. Davis, RJ. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." Cell **103**: 239-252.
 19. Davis, R.L., Weintraub, H., et al. (1987). "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblast to myoblast." Cell **51**: 987-1000.
 20. Dedieu, S., Mazeres, G., et al. (2003). "Myoblast migration is prevented by a calpain-dependent accumulation of MARCKS." Biology of the cell. **95**: 615-623.
 21. Dietrich, S. (1999). "Regulation of hypaxial muscle development." Cell Tissue Res **296**: 175-82.
 22. Dietrich, S. Abou-Rebyeh, F., et al. (1999). "The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle." Development **126**: 1621-1629.
 23. Du L., Lyle CS., et al. (2004). "Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity: evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK- independent." J Biol Chem. **279**: 11957-11966.
 24. Dubrulle J. and Pourquie, P. (2004). "fgf8 mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo." Nature **427**: 419-422.
 25. Florini, JR., Ewton, DZ., et al. (1996). "Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis." Endocr Rev. **17**: 481-517.
 26. Fuchs SY., Adler V., et al. (1998). "JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells." Genes Dev **12**: 2658-2663.
 27. Gilbert, S.F. (2000). Developmental Biology. Sunderland, Sinauer, S.447-454
 28. Ghosh-Choudhury, N., Abboud, S., et al. (2002). "Requirement of BMP-2-induced Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt Serine/Threonine Kinase in Osteoblast Differentiation and Smad-dependent BMP-2 Gene Transcription." J Biol Chem **277**: 33361-33368.
 29. Gredinger, E., Gerber, A.N., et al. (1998). "Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells." J Biol Chem **273**: 10436-10444.
 30. Gross, M.K., Moran-Rivard, L., et al. (2000). "Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb." Development **127**: 413-424.

31. Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1992). "A series of normal stages in the development of the chick embryo." Dev Dyn **195**: 231-72.
32. Han, J., Lee, J.-D., et al. (1996). "Characterization of the structure and function of a Novel MAP Kinsase Kinase (MKK6)." J Biol Chem **271**: 2886-2891.
33. Howe, A., Alpin, A.E., et al. (1998). "Integrin signaling and cell growth control." Curr Opin Cell Biol **10**: 220-231.
34. Ichijo, H. (1999). "From receptors to stress-activated MAP kinases." Oncogene **18**: 6087-6093.
35. Jiang, B., Ensign, W., et al. (1999). "Myogenic differentiation requires signalling through both phosphatidylinositol 3-kinase and p38 MAP kinase." Cell Signal **12**: 751-757.
36. Joneson, T., und Bar-Sagi, D., (1997). "Ras effectors and their role in mitogenesis and oncogenesis." J. Mol. Med. **75**: 587-593.
37. Kaliman, P., Canicio, J., et al. (1999). "Insulin like Growth Factor-II, Phosphatidylinositol 3-Kinase, Nuclear Factor- B and Inducible Nitric-oxide Synthase Define a Common Myogenic Signaling Pathway." J Biol Chem **274**: 17437-17444.
38. Kaul, A., Koster, M., et al. (2000). "Myf-5 revisited: loss of early myotome formation does not lead to a rib phenotype in homozygous Myf-5 mutant mice." Cell **102**:17-19.
39. Kawakami, Y., Rodriguez-Leon, J., et al. (2003). "MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb." Nat Cell Biol. **5**: 513-519.
40. Khurana, A. and Dey, C. (2004). "Involvement of c-Jun N-terminal kinase activities in skeletal muscle differentiation." Journal of Muscle Research and Cell Motility **25**: 645-655.
41. Kim, S.S., Kim J.H., et al. (2000). "Involvement of the theta-type protein kinase C in translocation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) during myogenesis of chick embryonic myoblasts." Biochem J. **347**: 139-146.
42. Kwiecenska P., Bartlomiej, R., et al. (2005). "Elevated expression of NF- κ B and Bcl-2 proteins in C2C12 myocytes during myogenesis is affected by PD98059, LY294002 and SB203580." Cell Biol Int. **29**: 319-331.
43. Lawlor, M.A., Feng, X., et al. (2000). "Dual control of muscle cell survival by distinct growth factor-regulated signaling pathways." Mol. Cell Biol. **20**: 3256-3265.
44. Lawlor, M.A., and Rotwein, P. (2000). "Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival: central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21." Mol. Cell Biol. **20**: 8983-8995.
45. Lewandowski, M., Sun, X., et al. (2000). "Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development." Nat Genet **26**: 460-463.

-
46. Li, L., Zhou, J. et al. (1992). "FGF inactivates myogenic helix-loop-helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase C site in their DNA-binding domain." Cell **71**: 1181-1194.
 47. Liu, ZG., Baskaran, R., et al. (1996). "Three distinct signalling responses by murine fibroblast to genotoxic stress." Nature **384**: 273-276.
 48. Löffler, G., Petrides, P. et al. (2003). Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, SpringerVerlag, S. 315-318.
 49. Maffucci, T., Piccolo, E., et al. (2005). "Inhibition of the phosphatidylinositol 3kinase/Akt pathway by inositol pentakisphosphate results in antiangiogenic and antitumor effects." Cancer Res. **65**: 8339-8349.
 50. Marics, I., Padilla, F., et al. (2002). "FGFR4 signaling is a necessary step in limb muscle differentiation." Development **129**: 4559-4569.
 51. Martin, G.R. (1998). "The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs." Genes Dev **12**: 1571-1586.
 52. Mc Donald, KA., Lakonishok, M., et al. (1995). "Alpha v and alpha 3 integrin subunits are associated with myofibrils during myofibrillogenesis." J Cell Sci **108**: 2573-2581.
 53. Mc Gee, MM., Campiani, G., et al. (2002). "Activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential during PBOX-6-induced apoptosis in chronic myelogenous leukemia (CML) cells." J Biol Chem **277**: 18383-18389.
 54. Mc Kinsey, T.A., Zhang, C.L., et al. (2000). "Signal dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation." Nature **408**: 106-111.
 55. Missero, C., Pirro, M. et al. (2000). "Multiple Ras downstream pathways mediate functional repression of the homeobox gene product TTF-1." Mol Cell Biol **20**: 2783-2793.
 56. Moxham, C., Davis, R., et al. (1996). "jun N-terminal Kinase mediates activation of skeletal muscle glycogen synthase by insulin in vivo." J Biol Chem. **271**: 30765-73.
 57. Musaro, A. and Rosenthal, N. (1999). "Maturation of the myogenic program is induced by postmitotic expression of insulin-like growth factor I." Mol. Cell Biol. **19**: 3115-3124.
 58. Nakae, J., Kido, Y. et al. (2001). "Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors." Endocr. Rev. **22**: 818-835.
 59. Niswander, L. (2003). "Pattern formation: old models out on a limb." Nat Rev Genet **4**: 133-143.
 60. Paul, A.C. and Rosenthal, N. (2002). "Different modes of hypertrophy in skeletal muscle fibers." J.Cell Biol. **156**: 751-760.
 61. Potapova, O., Gorospe, M., et al. (2000). "Inhibition of c-Jun-N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner." Mol Cell Biol **20**: 1713-1722.

-
62. Powers CJ., McLeskey SW., et al. (2000). "Fibroblast growth factors, their receptors and signaling." Endocr Relat Cancer **7**: 165-197.
 63. Raingeaud, J., Gupta, S. et al. (1995). "Pro-inflammatory Cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**: 7420-7426.
 64. Rommel, C., Clarke, B.A., et al. (1999). "Differentiation stage specific inhibition of the Raf-Mek-ERK pathway by Akt." Science **286**: 1738-1741.
 65. Rudnicki, M., Polesskaya, A., et al. (2003). "Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration." Cell **113**: 841-852.
 66. Rudnicki, M.A., Braun, T., et al. (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**: 383-390.
 67. Sambrook, J. and Russel, D. (2001). Molecular Cloning. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, S. 1-999.
 68. Sarbassow, D., Jones, L.G. et al. (1997). "Extracellular signal-regulated kinase-1 and -2 respond differently to myogenic and differentiative signaling pathways in myoblasts." Mol Endocrinol **11**: 2038-2047.
 69. Schafer, K. and Braun, T. (1999). "Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1." Nat Genet **23**: 213-216.
 70. Scheuerbrandt, G. (2006). 20 Years after finding the Duchenne Gen: A terrible Disease is being conquered. London, PPUK Muscular Dystrophy, S. 1-19.
 71. Schiebler, P. (1999). Anatomie. Berlin, Springer Verlag, S. 72-73.
 72. Schneid, M., Marignani, A., et al. (2002). "Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B." Mol. Cell Biol. **22**: 6247-6260.
 73. Sekine, K., Ohuchi, H., et al. (1999). "Fgf 10 is essential for limb and lung formation." Nat Genet **21**: 138-141.
 74. Shaoul, E., Reich-Slotky, R., et al. (1995). "Fibroblast growth factor receptors display both common and distinct signaling pathways." Oncogene **10**: 1553-1561.
 75. Sulpice, E., Bryckaert, M., et al. (2002). "Platelet factor 4 inhibits FGF2-induced endothelial cell proliferation via the extracellular signal-regulated kinase pathway but not by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway." Blood **100**: 3087-3094.
 76. Swierczynski, S.L., Palovuori, R., et al. (1995). "Membrane association of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein. Mutational analysis provides evidence for complex interactions." J.Biol.Chem. **270**: 13436-13445.

-
77. Takahashi, A., Kureishi, Y., et al. (2002). "Myogenic Akt signaling regulates blood vessel recruitment during myofiber growth." Mol.Cell Biol. **22**: 4803-4814.
 78. Tamir, Y. and Bengal, E. (2000). "Phosphoinositide 3-kinase induces the transcriptional activity of MEF2 proteins during muscle differentiation." J.Biol.Chem. **275**: 34424-34432.
 79. Tickle, C. and Münsterberg, A. (2002). "Vertebrate limb development - the early stages in chick and mouse." Curr Opin Genet Dev **11**: 476-481.
 80. Tsakiridis, T. Taha, C., et al. (1996). "Insulin activates a p21-activated Kinase in muscle cells via phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **271**: 19664-19667.
 81. Tureckova, J., Wilson, E.M., et al. (2001). "Insulin-like growth factor-mediated muscle differentiation: collaboration between phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-signaling pathways and myogenin." J Biol Chem **276**: 39264-39270.
 82. Vaaraniemi, J., Palovuori, R., et al. (1999). "Translocation of MARCKS and reorganization of the cytoskeleton by PMA correlates with the ion selectivity, the confluence, and transformation state of kidney epithelial cell lines." J Cell Physiol. **181**: 83-95.
 83. Vandromme, M., Rochat, A., et al. (2001). "Protein kinase B beta/Akt2 plays a specific role in muscle differentiation." J. Biol. Chem. **276**: 8173-8179.
 84. Wilkie, AO., Patey, SJ, et al. (2002). "FGFs their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations." Am J Med Genet **112**: 266-278.
 85. Wilson, EM., Hsieh, MM., et al. (2003). "Autocrine growth factor signaling by insulin-like growth factor-II mediates MyoD-stimulated myocyte maturation." J Biol Chem **278**: 41109-13.
 86. Wolpert, L. (1999). Principles of development Oxford, University Press, S.37, S.303-319.
 87. Xu, Q. and Wu, Z. (2000). "The insulin-like growth factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells." J. Biol. Chem. **275**: 36750-36757.
 88. Yaffe, D. and Saxel, O. (1977). "A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation." Differentiation **7**: 159-166.
 89. Zacci, P., Gostissa, M., et al. (2002). "The prolyl isomerase Pin-1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults." Nature **419**: 853-857.
 90. Zetser, A., Gredinger, E., et al. (1999). "p38 Mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation." J Biol Chem **274**: 5193-5200.
 91. Zlotogora, J. und Lever, I. (1999). "Homozygosity for Waardenburg Syndrome." Am J Human Genet **56**: 1173-1178.

7. 2. Fachwörter und Abkürzungen

| | |
|-----------|--|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| antisense | eng: in entgegengesetzter Orientierung |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| d.h. | dass heißt |
| Dig | Digoxigenin |
| DMEM | Dulbecco's Mod Eagle Medium; ein Zellkulturmedium |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DNS / DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure; Chelator von zweiwertigen Kationen |
| EtOH | Ethanol |
| et al. | et altera |
| FKS | fötales Kälberserum |
| G | Guanin |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| kb | Kilobasen; 1000 Basenpaare |
| Kit | Box mit allen Komponenten für eine bestimmte Reaktion |
| l | Liter |
| M | Molarität |
| MeOH | Methanol |
| min. | Minuten |
| MPCs | eng: muscle precursor cells; embryonale Muskelvorläuferzellen |
| mRNA | eng: messenger RNA; bei der Transkription gebildete Boten - DNA |
| PBS | Phosphat gepufferte Saline |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | Potentium Hydrogenii |
| Primer | Oligonukleotid, das zum Start der DNA - Synthese benötigt wird |
| RNA | Ribonukleinsäure |

| | |
|----------|--|
| Rnase | Ribonuklease |
| RNasin | RNase Inhibitor |
| RT | Raumtemperatur |
| sek. | Sekunde |
| T | Thymin |
| TAE | Tris - Acetat - EDTA - Puffer |
| t - RNA | transfer - Ribonukleinsäure |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Puffersubstanz |
| Tween 20 | Polyoxyethylensorbitan - Monolaurylsäure |
| U | Uracil |
| ü. N. | über Nacht |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| UTP | Uridintriphosphat |

7. 3. Thesen

1. Die *in vivo* am Hühnchenmodell durchgeführte Inhibition des AKT-Proteins (Phosphatidylinositol-3K/PDK1/AKT Signalkaskade) durch Injektion des AKT-Inhibitors in die für die Ausbildung der linken Vorderextremität verantwortliche Somitenregion führt zu einem fehlenden Auswachsen der linken Vorderextremität und macht dadurch eine Beurteilung der Migration *in vivo* unmöglich.

2. Die *in vitro* durchgeführte Inhibition von C2C12 Zellen durch den AKT-Inhibitor führt zu einer signifikanten Hemmung der Migration von myogenen Zellen.

3. Die *in vivo* am Hühnchenmodell durchgeführte Inhibition weiterer Signalkaskaden Proteine (JNK, PKC, PI3-K, MEK) zeigt, nach Injektion der Inhibitoren und anschließender Whole mount *in situ* Hybridisierung, keine Veränderungen in der Expression der für die Migration von Muskelvorläuferzellen entscheidenden Marker Lbx1 und Pax3.

4. Die *in vitro* durchgeführte Inhibition von C2C12 Zellen durch die PKC-, MEK-, PI3-K-, und JNK-Inhibitoren führen zu keiner Hemmung der Migration der Zellen.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|------------|-------------------------------------|
| | Benjamin Stitz |
| | Ledig |
| Geburtstag | 01.07.1980 |
| Adresse | Leutfresserweg 27 C, 97082 Würzburg |
| Telefon | 0931/72417 |
| Mobil | 0177/2115684 |
| E-Mail | benjamin-stitz@web.de |

Schule

| | |
|-------------------|--|
| 09.1986 - 08.1990 | Burkarder Grundschule in Würzburg |
| 09.1990 - 06.1999 | Deutschhaus - Gymnasium in Würzburg <i>Abschluss:</i> Allgemeine Hochschulreife |

Zivildienst

| | |
|-------------------|---|
| 07.1999 - 07.2000 | Johanniter Unfallhilfe e.V. Würzburg |
| | Tätigkeit im mobilen sozialen Hilfsdienst |
| | <i>Ausbildung:</i> Pflegehelfer |

Schnupperstudium

| | |
|---------|------------------------------------|
| 06.2000 | Schnupperstudium Medizin in Berlin |
|---------|------------------------------------|

Rettungsdienst

| | |
|-------------------|---|
| 09.2000 - 10.2001 | Johanniter Unfallhilfe e.V. Würzburg |
| | Tätigkeit als haupt- und ehrenamtlicher Mitarbeiter im Rettungsdienst |
| | <i>Ausbildung:</i> Rettungssanitäter |

Studium

| | |
|-------------------|--|
| 11.2001 – 10.2007 | Studium der Humanmedizin an der Martin - Luther Universität in Halle, voraussichtliche Approbation im Herbst 2007 |
| 08.2003 | Staatsprüfung Physik |
| 07.2007 | momentan Praktisches Jahr |

Eidesstattliche Erklärungen

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Halle, 07. Juli 2007

.....

Benjamin Stitz

Hiermit versichere ich, dass ich bisher keine anderen Promotionsversuche unternommen habe, und dies somit mein erster Promotionsversuch ist.

Halle, 07. Juli 2007

.....

Benjamin Stitz